



Réponses cellulaires vis-à-vis de l'exposition au cadmium chez les animaux

Estelle Rousselet

► To cite this version:

Estelle Rousselet. Réponses cellulaires vis-à-vis de l'exposition au cadmium chez les animaux. Biologie cellulaire. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2007. Français. NNT : . tel-00584238

HAL Id: tel-00584238

<https://theses.hal.science/tel-00584238>

Submitted on 7 Apr 2011

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER-GRENOBLE 1

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

Discipline : BIOLOGIE

Présentée et soutenue publiquement

Par

Estelle ROUSSELET

Réponse cellulaire vis-à-vis de l'exposition au cadmium chez les animaux

Thèse soutenue le 29 octobre 2007 devant le jury composé de :

Prof. Alain FAVIER
Prof. Pierre MIRAMAND
Dr. Philippe POGNONEC
Dr. Sylvie CHEVILLARD
Dr. Florent GUILLAIN
Dr. Jean-Marc MOULIS

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examinatrice
Directeur de thèse
Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Le travail présenté dans ce rapport a été effectué dans le laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux anciennement laboratoire de Biophysique Moléculaire et Cellulaire du Commissariat à l'Energie Atomique de Grenoble. Je tiens à remercier Florent Guillain pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, ainsi que pour sa gentillesse et son sens de l'humour.

Je tiens ensuite à remercier les membres de mon jury de thèse pour m'avoir fait l'honneur d'accepter d'examiner mon travail.

Je souhaite ensuite remercier tout particulièrement Jean-Marc Moulis. Merci Jean-Marc de m'avoir donné la possibilité de travailler avec toi et d'effectuer cette thèse, de m'avoir fait confiance dans toute la réalisation de ce travail. Merci pour ta disponibilité, ta franchise, ta patience et ton soutien.

Je remercie Jacques Meyer pour son soutien ainsi que sa femme Christine. Un grand merci pour toutes les personnes avec lesquelles j'ai pu collaborer lors de mon travail de thèse et qui m'ont permis de m'ouvrir à une autre manière d'aborder un problème, merci au docteur Sylvie Chevillard de m'avoir donné l'opportunité de travailler dans son laboratoire du CEA de Fontenay-aux-Roses et à toute son équipe, avec une mention spéciale pour Nicolas Ugolin que j'ai souvent sollicité pour la compréhension du traitement des données bio-informatiques ; merci à Thierry Douki, Jocelyne Chantegrel et Olivier Falletti ; à Thierry Rabilloud et Mireille Chevallet, à Muriel Viau et Serge Candéias et enfin à Pierre Richaud et Alexandre Bouron. Merci à tous pour votre aide et pour tout ce que nos discussions m'ont apporté.

Je remercie Camille et Alain, avec qui j'ai travaillé au quotidien pendant deux ans, ainsi que Christel. Merci à vous deux, Christel et Camille pour votre réconfort dans les moments difficiles et pour les moments de rire intense qu'on a partagé.

Merci à Lilie qui m'a toujours soutenue, à Caro (il en a deux), Béa, Julien, Heidi et Sandrine, Peggy, Pat, Martine, enfin bref, tous ceux qui font que le labo devient notre seconde maison...

A ma famille, et ma seconde famille, pour leur soutien et leur amour.

Et enfin à toi, mon Amour, mon Mana, qui m'a toujours soutenu dans mes projets et mes choix.

A mon Mana,

SOMMAIRE

INTRODUCTION

I. Les pathologies liées à l'exposition au cadmium.....	19
I-1 Présentation du cadmium	19
I-2 Lésions hépatiques et rénales	20
I-3 Pathologies osseuses.....	22
I-4 Pathologies pulmonaires.....	24
II. Systèmes d'Entrée-Sortie cellulaires du cadmium.....	25
II-1 <i>Divalent Metal Transporter 1</i>	25
II-2 Les transporteurs du zinc	26
II-3 Les canaux calciques	29
II-4 Les pompes d'efflux	30
II-5 Les transporteurs de manganèse	34
II-6 Récapitulatif des systèmes d'entrée et de sortie cellulaire du cadmium.....	35
III. Mécanismes de toxicité moléculaires du cadmium.....	37
III-1 Interférence avec l'homéostasie des métaux essentiels	37
III-2 Production d'Espèces Réactives de l'Oxygène par le cadmium	38
III-2 a. Présentation du stress oxydant.....	38
III-2 b Mécanismes antioxydants.....	40
III-2 c Effets du cadmium sur la production de ROS	42
III-2 d Les ROS : signaux moléculaires.....	44
III-3 Effets du cadmium sur la régulation des gènes	46
III-3 a Induction des métallothionéines (MT)	46
III-3 b <i>Metal-responsive element-binding transcription factor-1</i> MTF-1	49
III-3 c Induction de la synthèse du glutathion	51
III-3 d Induction de l'hème oxygénase-1	52
III-3 e Suppression de l'activité de Sp1 (<i>Specificity protein 1</i>).....	53

III-4 Rôle du réticulum endoplasmique (RE) dans les mécanismes moléculaires de résistance au cadmium.....	54
III-4 a Présentation du RE.....	54
III-4 b La réponse UPR.....	55
III-4 c Les protéines de stress.....	59
III-4 c1 Induction de l'expression des Hsp.....	59
III-4 c2 Rôle des Hsp vis-à-vis du stress cadmium.....	60
III-5 Effets du cadmium sur la signalisation cellulaire.....	64
III-5 a Activation de la voie de signalisation ERK.....	66
III-5 b Activation de la voie de signalisation JNK/SAPK.....	67
III-5 c Activation de la voie de signalisation p38.....	69
III-5 d Fonctions biologiques des voies de signalisation des MAPK.....	70
III-5 e Rôle du cadmium dans la signalisation.....	72
IV. Objectifs du travail de thèse.....	75

CHAPITRE 1 : ETUDE DES MECANISMES DE RESISTANCE VIS-A-VIS DU CADMIUM D'UNE LIGNEE CELLULAIRE DERIVEE DE LA LIGNEE EPITHELIALE HELA.

I-1. Etudes antérieures des mécanismes de résistance vis-à-vis du cadmium....	78
I-2. Présentation du modèle cellulaire utilisé.....	81
I-3. Présentation des axes de travail.....	82
I-4. ARTICLE 1: Resistance to high zinc concentrations of a human epithelial cell line imparts them with insensitivity to large cadmium challenges.....	84
I-5. Résumé de l'article 1.....	127
I-6.1 Effets du cadmium sur les deux lignées cellulaires HeLa et HZR.....	127
I-6.2 Rôle du zinc dans la résistance vis-à-vis du cadmium	128
I-7.2 Informations obtenues sur l'origine de la résistance des cellules HZR vis-à-vis du cadmium.....	129

I-6. Résultats complémentaires.....	131
I-6.1 Mort cellulaire et dommages à l'ADN.....	134
I-6.2 Etude des réponses calciques des deux lignées cellulaires HeLa et HZR.....	134
I-6.2 a Mise en évidence de la présence de canaux capacitifs d'entrée du calcium.....	134
I-6.2 b Mise en évidence de l'entrée de cadmium.....	136
I-6.2 c Tests d'inhibition de l'entrée de cadmium.....	140
I-7. Mécanismes de toxicité du cadmium.....	142

CHAPITRE 2 : ETUDE DE L'EFFET DU CADMIUM SUR L'HOMEOSTASIE DU FER CHEZ LES MAMMIFERES.

II-1. Régulation de l'homéostasie du fer chez les mammifères.....	145
II-1.1 Le fer : un métal au rôle dual.....	145
II-1.2 Entrée du fer dans les cellules par endocytose.....	146
II-1.3 Système IRP/IRE : bio-marqueur du fer intracellulaire.....	147
II-2. Présentation des axes de travail.....	150
II-3. ARTICLE 2: Effect of cadmium stress on the mammalian Iron Regulatory Proteins.....	150
II-4. Résultats et discussion.....	177
II-4.1 Comparaison entre les différentes études sur l'effet du cadmium et son interaction avec le fer <i>in vivo</i> et intérêt de notre étude.	178
II-2.2 Interaction entre le cadmium et l'homéostasie du fer par comparaison entre les cellules épithéliales HeLa et les cellules résistantes au zinc.....	178
II-2.3 Rôle d'un chélateur de fer : la desferrioxamine.....	180

CHAPITRE 3: EXAMEN DE QUELQUES ASPECTS MOLECULAIRES CONTRIBUANT AU PHENOTYPE DE LA LIGNEE HZR RESISTANTE AU ZINC ET COMPARAISON AVEC LA LIGNEE PARENTE HELA.

ARTICLE 3: Cadmium resistance of mammalian cells by adaptation to zinc. Molecular insight by proteomic analysis.....	185
--	-----

CHAPITRE 4 : ETUDE DE L'EFFET DU CADMIUM ET DU ZINC SUR LA REPONSE TRANSCRPTIONNELLE DES CELLULES HZR.

IV-1. Présentation des axes de travail.....	217
IV-2. Définition et principaux types de puces à ADN	218
IV-3. Stratégie d'étude.....	221
IV-3.1 Culture cellulaire et traitements	221
IV-3.2 Principe de l'hybridation sur puces.....	223
IV-3.2 a La puce utilisée.....	226
IV-3.2b Préparation des ARN (voir partie expérimentale).....	226
IV-4 Acquisition et analyse des données.....	227
IV-4.1 Acquisition des images.....	227
IV-4.2 Quantification et normalisation des rapports d'expression de gènes.....	227
IV-4.2 a Elimination du bruit de fond et calcul d'un facteur de robustesse.....	227
IV-4.2 b Calcul des rapports d'expression	230
IV-4.2 c Normalisation.....	231
IV-4.2 d Classement et ordonnancement des gènes.....	231
IV-5 Résultats.....	235
IV-5.1 Vérification du phénotype	235
IV-5.2 Définitions.....	237
IV-5.3 Détermination des gènes variants et invariants	237
IV-5.3 a Gènes différentiellement exprimés.....	238
IV-5.3 b Validation de quelques gènes différentiellement exprimés.....	248
IV-5.3 b1 Méthodologie.....	249
IV-5.3 b2 Validation des amorces.....	250
IV-5.3 b3 RT-PCR Quantitative.....	253
IV-5.4 Examen des gènes régulés par MTF-1.....	257
IV-5.5 Recherche des candidats responsables de la résistance des cellules HZR vis-à-vis du cadmium.....	258
IV-5.6 Examen des autres candidats différentiellement exprimés entre les conditions T0T24 vs -Zn.....	262

IV-5.7 Aperçu succinct des analyses conduites sur les résultats des données d'expression.	263
IV-5.8 Analyse globale des gènes régulés par la concentration de zinc dans les cellules HZR. Recherche de candidats pouvant expliquer le phénotype de ce clone.....	264
IV-5.9 Analyse globale des gènes régulés en présence de cadmium dans les cellules HZR.	267
✓ <i>ajout de cadmium aux cellules cultivées en présence de zinc</i>	267
✓ <i>manipulation du zinc sur des cellules exposées au cadmium</i>	269
✓ <i>substitution du zinc par le cadmium</i>	269
IV-5.10 Examen de gènes non inclus dans des réseaux biologiques.....	272
IV-5.11 Conclusion : Caractéristiques générales de l'analyse transcriptomique globale réalisée pour les cellules HZR.....	272

CONCLUSION GENERALE.....275

MATERIELS ET METHODES.....285

TAMPONS.....287

METHODES GENERALES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE.....287

Extraction de l'ADN par une solution de Phénol/Chloroforme/3-méthyl-1-butanol

Préparation de la sonde IRE en présence de traceur radioactif

METHODES GENERALES DE BIOCHIMIE.....288

Dosage de la concentration des protéines.....288

Dosage de la concentration d'ADN (ARN).....288

Analyse des protéines sur gel dénaturant de polyacrylamide.....288

Analyse des protéines par immuno-empreinte.....289

CHAPITRE 1.....289

1.1 Cultures cellulaires.....289

1.2 Détermination de la viabilité cellulaire.....289

1.3 Courbes de titrage de la sonde fluorescente BTC-5N en présence de zinc/cadmium

1.4 Localisation du cadmium intracellulaire par microscopie confocale.....289

1.5 Mesure des cassures de l'ADN par la méthode des COMET.....289

1.6 Mesure de la 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine.....289

1.7 Détection des protéines oxydées	289
1.8 Mesure de la production d'espèces réactives de l'oxygène..	289
1.9 Mesure du taux de glutathion.....	289
1.10 Mesure de la concentration intracellulaire de zinc et cadmium.....	289
1.11 Mesure du taux d'expression des transcrits par RT-PCR semi-quantitative.	289
1.12 Imagerie des flux cationiques	290
CHAPITRE 2.....	290
2.1 Traitements cadmium administrés aux souris.....	290
2.2 Numération sanguine.....	290
2.3 Préparation des lysats à partir des organes de souris.....	290
2.4 Electrophoretic Mobility Shift Assay	290
2.5 Analyse des protéines sur gel dénaturant de polyacrylamide, transfert sur membrane de nitrocellulose et détection immuno-chimique d'IRP1 (Western-Blot).....	290
CHAPITRE 3	
3.1 Préparation des lysats cellulaires pour analyse par électrophorèse bi- dimensionnelle.....	290
3.2 Electrophorèse bi-dimensionnelle.....	290
3.3 Digestion des spots excisés.....	290
3.4 Real Time - Polymerisation Chain Reaction quantitative.....	290
CHAPITRE 4.....	290
4.1 Préparation des ARN pour hybridation sur puce.....	290
Extraction et contrôle de la qualité des ARN.....	290
Amplification.....	291
Préparation des fluorochromes.....	293
Couplage des fluorochromes.....	294
Evaluation de l'incorporation des fluorochromes.....	294
Fragmentation des ARN antisens marqués Cy3 ou Cy5.....	295
Préparation des lames pour l'hybridationHybridation.....	296
Lavages après hybridation.....	296
4.2 Validation des gènes utilisés pour la RT-PCR quantitative.....	296
Synthèse du premier brin d'ADNc.....	296

RT PCR Quantitative.....	296
<u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u>	299
<u>ANNEXES</u>	322

Annexe 1 : Cadmium toxicity in animal cells by interference with essential metals

LISTE DES FIGURES

INTRODUCTION

Figure 1: Difformités osseuses constatées chez les japonais souffrant de la maladie Itai-Itai.....	23
Figure 2: Modèle topologique de structures secondaires prédites pour MRP1 et-2 (A) et la P-glycoprotéine (B).....	31
Figure 3: Le radical superoxyde comme source de peroxyde d'hydrogène et du radical hydroxyle.....	38
Figure 4 : Cycles des systèmes antioxydants impliquant thiorédoxine et glutarédoxine.....	42
Figure 5 : Structure tridimensionnelle de métallothionéine chez le rat.....	47
Figure 6 : Structure tridimensionnelle d'une portion de MTF-1.....	47
Figure 7 : Représentation schématique de hMTF-1 (humain), mMTF-1 (souris) et fMTF-1 (poisson).....	49
Figure 8 : Modèle illustrant les fonctions de MTF-1.....	50
Figure 9 : Mécanisme d'activation des HSP 70.....	60
Figure 10 : Les voies de signalisation des MAP kinases. Les différents modules MAP kinases chez les mammifères régulent la croissance cellulaire, la réponse au stress, la différenciation et le développement.....	65

CHAPITRE 1

Figure I-1 : Répartition du nombre de cellules en fonction du pourcentage d'ADN présent dans la queue de la COMET.....	131
Figure I-2 : Détermination du type de mort cellulaire privilégié dans les deux types cellulaires suite à un stress cadmium.....	132
Figure I-3 : Histogramme représentant le nombre de cellules ayant un pourcentage donné d'ADN présent dans la queue d la comète.....	132
Figure I-4 : Intensité relative de fluorescence en fonction du métal chélaté par le Fluo-4....	134

Figure I-5 : Comparaison de l'entrée capacitive du calcium détecté par la sonde Fluo-4	137
Figure I-6 : Variations de fluorescence suite à l'application d'ionomycin	137
Figure I-7 : Flux ioniques détectés par le fluo-4 suite à l'application de thapsigargine puis de cadmium.....	139
Figure I-8 : Effet du cadmium sur la viabilité des cellules HZR maintenues dans un milieu sans zinc pendant une semaine.....	138
Figure I-9 : Effets de la nifédipine, de l'acide octadécén(6)oïque et de manganèse sur les flux ioniques détectés pr le Fluo-4.....	141

CHAPITRE 2

Figure II-1 : Régulation cellulaire de l'homéostasie du fer par le système <i>IRP-IRE</i> (<i>Hentze et al., 2004</i>).....	149
Figure II-2 : Dosage du cadmium dans divers organes de souris.....	175
Figure II-3 : Effet de la desferrioxamine sur la viabilité des cellules vis-à-vis du cadmium.....	176

CHAPITRE 4

Figure IV-1 : Différents types de puces pour étudier le transcriptome.....	220
Figure IV-2 : Analyse de l'expression transcriptionnelle sur une puce spottée	221
Figure IV-3 : Hybridation différentielle.....	225
Figure IV-4 : Hybridation en double inverse	226
Figure IV-5 : Vérification de la qualité des ARN totaux par électrophorèse sur gel d'agarose (partie matériels et méthodes).....	291
Figure IV-6 : Vérification de la qualité des ARN amplifiés par électrophorèse sur gel d'agarose (partie matériels et méthodes).....	293

Figure IV-7 : Détermination de la reproductibilité des couples (RefCy3, RefCy5) de valeurs pour une hybridation en double inverse.	229
Figure IV-8 : Viabilité vis-à-vis du cadmium des cultures de cellules HZR utilisées pour les études transcriptomiques.....	236
Figure IV-9: Courbes standard effectuées pour les gènes qui permettront la normalisation par rapport aux gènes d'intérêt.....	253
Figure IV-10 : Séquence codante des gènes des différents isoformes de la MT-1	257
Figure IV-11: Flux ioniques détectées par le Fluo-4 suite à l'incubation dans l'ouabaïne ou le vanadate ou suite à l'application de thapsigargine ou non	260
Figure IV-12: Expérience identique enregistrée sur des cellules HZR dont le zinc a été enlevé pendant une semaine.	260
Figure IV-13 : Super-réseau des gènes participant au phénotype HZR	266
Figure IV-14 : Super-réseau des gènes correspondant à l'effet additif du cadmium sur un fond zinc.....	268
Figure IV-15 : Réseaux individuels de gènes correspondant à la substitution du zinc par le cadmium.....	270

ABREVIATIONS

2ME : 2-mercaptoéthanol
ARE : *Antioxidant Responsive Element*
DMT1: *Divalent Metal Transporter 1*
DTT: Dithiothréitol
eIF2- α : *Eukaryotic translation initiation factor 2*
ERAD: *ER associated protein degradation*
ERK1/2: *Extracellular-regulated protein kinases 1 and 2*
GRE : *Glucocorticoid Responsive Element*
GSH: glutathion (γ -Glu-Cys-Gly)
HeLa: *Human cervical cancer cells*
Hif-1: *Hypoxia inducible factor*
HO: *Heme oxygenase*
HPPD: 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygénase
HSE: *Heat Shock Element*
HSF: *Heat Shock Factor*
Hsp: *Heat Shock Proteins*
HZR: High Zinc Resistant HeLa cells
I κ B: *Inhibitory kappa B*
IRE: *Iron Responsive Element*
IRE1 α et β : *Inositol requiring enzyme 1*
IRP: *Iron Regulatory Proteins*
JNK : *c-Jun NH2-terminal kinase*
MAPK: *Mitogen-activated protein kinase*
MG132: tripeptide aldehyde leu-leu-leu
MK2: *MAP kinase activated kinase 2*
MRE: *Metal Responsive Element*
MRP : *Multidrug Resistance Proteins*
MTF-1: *Metal-responsive element-binding transcription factor-1*
NADPH: nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NF κ B: *Nuclear factor kappa B*
NTBC: 2-[2-nitro-4-(trifluorométhyl)benzoyl]-1,3-cyclohexanedione
OGG1 : *8-oxoguanine-DNA glycosylase*
PERK: *Protein kinase-like ER kinase*
RE: Réticulum endoplasmique
SERCA: *sarcoendoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase*
SDS: Sodium Dodecyl Sulfate
TNF- α : *Tumor Necrosis Factor alpha*
Tris: Tris(hydroxyméthyl)aminométhane
UPR: *Unfolded Protein Response*
USF: *Upstream Stimulatory Factor*
VEGF: *vascular endothelial growth factor*
XBP-1: *X-box binding protein*
ZIP: *Zrt/Irt-like Proteins*
ZRF: *Zinc Regulatory Factor*

INTRODUCTION

I. Les pathologies liées à l'exposition au cadmium

I-1 Présentation du cadmium

Le cadmium est un métal de transition toxique au centre de nombreuses préoccupations environnementales. Le cadmium a en effet été désigné par l'IARC (International Agency for Research on Cancer) comme un cancérigène de catégorie 1 par inhalation. De plus, de nombreuses études permettent de penser que ce métal peut induire de multiples cancers comme certains affectant le rein, le poumon, les testicules ou la prostate. D'autres études l'impliqueraient dans des tumeurs du pancréas mais cela n'a pas été fermement établi (Waalkes, 2003). Mais la toxicité du cadmium ne se limite pas à ses propriétés cancérigènes comme détaillé plus loin.

Le cadmium est un métal blanc, mou et malléable classé communément comme un métal lourd. Cette appellation est relative, sans réelle justification scientifique et elle caractérise généralement des métaux ayant une masse volumique élevée, supérieure à 5g/cm^3 . Les métaux lourds sont présents dans tous les compartiments de l'environnement, mais en quantités très faibles en général. Ces métaux sont souvent sous forme de cations en solution. Ils n'ont pas de rôle biologique chez les animaux et la plupart des cellules vivantes.

Le cadmium est un élément naturellement associé au zinc dans certains minerais. Il était inconnu jusqu'au XIX^{ème} siècle, quand ses caractéristiques physico-chimiques ont été mises en évidence et utilisées plus tard notamment dans les batteries. Le cadmium a aussi servi pour protéger l'acier contre la corrosion (cadmiage), ou encore comme stabilisant pour les plastiques et comme pigment dans les produits céramiques (Jarup, 2002). Le traitement des ordures ménagères est le premier secteur responsable des émissions de cadmium qui sont relativement stables.

Les principales causes d'exposition de l'Homme au cadmium sont l'**alimentation** (poissons, mollusques bivalves, végétaux dont les légumes riches en fibres) (Jarup, 2002; Satarug and Moore, 2004) et le **tabagisme** où le métal inhalé se répartit entre une partie repoussée vers le tractus gastro-intestinal par action mucociliaire, une autre migre dans les terminaisons du bulbe olfactif des neurones et une dernière interagit avec les **alvéoles pulmonaires** (Satarug and Moore, 2004). Le cadmium n'est pas neurotoxique puisqu'il ne franchit pas la barrière hémato-encéphalique. Chez l'Homme, l'**absorption intestinale** de

cadmium est environ de 30 µg par jour mais varie principalement en fonction de l'âge (absorption plus facile chez l'enfant), de divers paramètres biologiques, y compris le sexe (homme, femme ou femme enceinte), ainsi que du régime alimentaire (Jarup, 2002; Satarug and Moore, 2004). L'efficacité de l'**absorption** dépend des conditions d'exposition au métal : seulement 5% du métal ingéré est absorbé par le tractus **gastro-intestinal**, essentiellement sous forme de sel, tandis que 90% du cadmium inhalé est absorbé par **voie pulmonaire** (Jarup, 2002). Une diète où les **apports en fer, zinc et calcium sont faibles** favorise l'**ingestion** et l'**accumulation** du cadmium dans le duodénum (Reeves and Chaney, 2004; Reeves et al., 2005).

Les conséquences pathologiques varient avec l'intensité d'exposition : une intoxication aiguë provoque la fièvre des fondeurs, des douleurs de type rhumatismales, ainsi qu'une atteinte pulmonaire dans les cas d'inhalation. Une intoxication chronique conduit à une accumulation de cadmium, dont la demi-vie est estimée de 15 à 20 ans (Jarup, 2002), dans les tissus comme le foie, les reins, les poumons et également le squelette. Les différents dommages cellulaires suite à une exposition chronique s'expliquent par le fait que **seulement une très faible proportion de cadmium est excrétée de l'organisme** (< 10%) principalement dans l'urine et les selles (Jarup, 2002). Les dommages qui en résultent sont des **lésions hépatiques ou rénales**, des **dommages pulmonaires** plus ou moins intenses pouvant engendrer des cancers, ainsi qu'une **perturbation de la calcification/décalcification** conduisant même pour des expositions extrêmement prolongées à un **remodelage osseux**. Ainsi, la localisation du cadmium dans les tissus dépend de la durée et de l'intensité de l'exposition. Suite à une unique injection ou prise orale de cadmium, une forte accumulation a lieu dans le foie et très faiblement dans les reins de souris, tandis que la distribution du métal évolue dans le temps pour se concentrer dans le cortex rénal (Swiergosz-Kowalewska, 2001).

I-2 Lésions hépatiques et rénales

Il y a eu de nombreuses études sur les **effets néphrotoxiques** du cadmium chez des travailleurs exposés comme dans la région du comté de Kalmar en Suède, en Belgique ou bien dans le bassin du Jinzu au Japon (Satarug et al., 2003). Le premier signe de lésions rénales est une augmentation de la protéinurie tubulaire, caractérisée par l'excrétion urinaire de certaines protéines de faible masse moléculaire, dont la β2-microglobuline, l'α1-microglobuline et la *N*-acétylglucosaminidase (Jarup, 2002). Ces protéines sont normalement filtrées par le glomérule et réabsorbées dans les tubules proximaux; leur excrétion dans l'urine indique donc

des **lésions des tubules proximaux**. L'induction de la protéinurie tubulaire par le cadmium est irréversible et peut évoluer vers des **dommages glomérulaires** avec une forte diminution de l'efficacité de la filtration glomérulaire se caractérisant par l'excrétion urinaire de protéines de masse moléculaire élevée, comme l'albumine, une augmentation de l'excrétion urinaire de glucose, d'acides aminés, de calcium, de phosphore et d'acide urique, et une réduction de la capacité de concentration des reins. Ainsi, le cadmium inhibe la réabsorption de calcium probablement en bloquant un canal calcique situé dans le tubule distal, et cela conduit à une hypercalcinurie ainsi qu'à la formation de caillots (Barbier et al., 2004).

Au niveau cellulaire, suite à l'absorption du cadmium par voie gastro-intestinale ou pulmonaire et au passage dans la circulation sanguine, **le cadmium sous forme de complexe avec diverses protéines comme l'albumine, aboutit rapidement au foie**. C'est un organe où se produisent de nombreuses réactions permettant la détoxification et en particulier le lieu de conjugaison du toxique au **glutathion** (GSH). Les cellules hépatiques sont très riches en GSH et en **métallothionéines** (MT). Ces deux types de molécules possèdent une forte affinité pour le cadmium et forment des complexes **Cd-GSH**, qui peuvent être **excrétés dans la bile**, et des complexes **Cd-MT** qui restent **stockés dans le foie ou sont dirigés vers les reins** (Klaassen et al., 1999). L'arrivée des complexes Cd-MT ou Cd-GSH dans les tubules proximaux conduit à une excrétion de 50% du complexe et à 50% de réabsorption par endocytose (Barbier et al., 2005). Dans ce dernier cas le complexe est dégradé par les lysosomes libérant ainsi du cadmium qui est susceptible d'interagir avec d'autres composants cellulaires et de les endommager si le métal n'est pas repris en charge. **Le complexe Cd-MT filtré à travers le glomérule puis absorbé par les tubules proximaux est responsable de la néphrotoxicité** (Tang et al., 1998). Néanmoins, l'endocytose n'est pas le seul mécanisme de réabsorption du métal, celui-ci peut également être complexé au GSH puis clivé par la γ -glutamyl-transférase pour former un complexe avec la cystéine pris en charge par un transporteur d'acides aminés en association avec un symport de sodium (Barbier et al., 2005).

I-3 Pathologies osseuses

Les effets secondaires du cadmium attribuables à la perturbation du bilan du calcium, ainsi que du phosphore, comprennent **l'hypercalciurie**, qui se caractérise par une excrétion urinaire du calcium supérieure à 0,1 mmol/kg en 24 heures, une **diminution de la densité minérale osseuse**, une réduction de la concentration de phosphates dans le sang, la formation de calculs rénaux, ainsi que **l'ostéoporose et l'ostéomalacie** qui est un défaut de minéralisation de la matrice osseuse organique. De nombreuses études épidémiologiques ont été réalisées au Japon, à partir de la fin des années 1940, notamment dans la préfecture de Toyama polluée par le cadmium provenant de mines de zinc desquelles le cadmium était rejeté dans la rivière Jinzu comme sous-produit. Ces études étaient destinées à élucider le rôle du cadmium dans la **maladie Itai-Itai** (signifiant littéralement: «aïe, aïe»), une maladie endémique pour la population alentour. Les symptômes caractéristiques de cette maladie sont l'ostéomalacie, l'ostéoporose et une dysfonction rénale. Il a été détecté de fortes concentrations de cadmium et de zinc dans les sols et les eaux de cette région. Bien que la concentration de zinc dans le riz produit localement et que l'excrétion urinaire de zinc et de plomb par les habitants aient été similaires dans les régions polluées et dans les régions témoins, la concentration de cadmium dans le riz et l'excrétion de cadmium étaient plus élevées dans les régions polluées. Le contenu en cadmium présent dans le squelette des individus affectés était beaucoup plus important que chez les individus non exposés (pour les hommes, 2.7 µg/g comparé à 0.3µg/g et pour les femmes 1.8 µg/g comparé à 0.6 µg/g) (Jarup, 2002).

Les **difformités osseuses** constatées chez de nombreux japonais atteints de la maladie *Itai-Itai* sont la **manifestation tardive d'une grave intoxication chronique au cadmium**, secondaire par rapport au dysfonctionnement des tubules rénaux. Les études montrent que les carences alimentaires (particulièrement en vitamine D et en calcium) contribuent aux effets observés. La dégénérescence osseuse qui s'ensuit a été observée presque exclusivement chez des femmes, notamment ménopausées, plus facilement sujettes à un déséquilibre minéral et notamment calcique.

L'homéostasie calcique au niveau de l'organisme est principalement régulée par trois acteurs:

-**L'hormone parathyroïdienne** qui agit sur les tubules proximaux et distaux des reins afin d'augmenter la réabsorption de calcium et de diminuer celle du phosphate. Cela conduit à une augmentation du calcium plasmatique.

-**La calcitonine** qui inhibe l'activité des ostéoclastes, ce qui diminue le calcium sérique. Ainsi la calcitonine agit en opposition de l'hormone parathyroïdienne ce qui garantit un équilibre calcique.

-**Le calcitriol** (1,23 dihydroxy vitamine D3), produit du métabolisme de la vitamine D qui augmente l'absorption intestinale de calcium afin d'augmenter la réabsorption de matrice osseuse minérale.

Une série d'expériences a été menée afin de comprendre par quels mécanismes le cadmium induisait de tels effets sur la masse osseuse. Plusieurs explications ont été apportées (Kazantzis, 2004) parmi lesquelles:

- Les dommages rénaux engendrés par le cadmium provoquent une **diminution de la réabsorption de calcium** et de la métabolisation de la vitamine D et, ainsi, une **diminution de l'absorption intestinale de calcium**. La diminution de l'absorption calcique par le cadmium pourrait également s'effectuer par compétition directe.

- Une **diminution de l'incorporation du calcium** et de la production de collagène dans les cellules osseuses ce qui indique une **interférence directe du cadmium avec la minéralisation osseuse**.

La toxicité du cadmium au niveau osseux résulte donc de l'addition de plusieurs mécanismes complexes d'interférence du cadmium principalement sur l'homéostasie calcique.



Figure 1 : Difformités osseuses constatées chez les japonais souffrant de la maladie Itai-Itai.

Photo prise en 1968 par Ishizaki

I-4 Pathologies pulmonaires

Le contenu en cadmium du tabac est élevé à cause des propriétés des plantes *Nicotiana* qui peuvent accumuler le cadmium en se préservant de ses effets délétères. Le cadmium présent dans le tabac varie entre 0.5 à 1 µg/cigarette. L'oxyde de cadmium produit au cours de la combustion est fortement biodisponible. Environ 10% de **l'oxyde de cadmium** inhalé se dépose dans les **alvéoles pulmonaires** et 30 à 40% passe dans la **circulation sanguine** par un mécanisme non élucidé à ce jour mais qui pourrait utiliser le transporteur DMT1 (voir plus loin). Les fumeurs ont donc une concentration sanguine de cadmium 4 à 5 fois plus élevée que les non-fumeurs et ils accumulent 2 à 3 fois plus de métal dans les reins (Satarug and Moore, 2004). Aussi, comme dans le cas d'une intoxication aiguë par inhalation de particules atmosphériques, le cadmium sous forme de très fines particules solides issues de la combustion du tabac peut s'accumuler et se déposer dans les alvéoles pulmonaires. Il en résulte des fibroses interstitielles et des emphysèmes (Hart et al., 2001) allant même jusqu'aux adénocarcinomes pulmonaires (Waalkes, 2003). Les mécanismes par lesquels le cadmium engendre ces pathologies ne sont pas entièrement compris mais sa capacité à produire un stress oxydant semble importante dans le mécanisme de cancérogénèse.

II. Systèmes d'Entrée-Sortie cellulaires du cadmium.

Le cadmium est un métal n'ayant **aucun rôle biologique** dans les cellules animales. Il ne possède par conséquent aucune voie d'entrée ou de sortie qui lui soit spécifique. Le cadmium agit donc par **mimétisme de métaux physiologiques** ou d'autres molécules afin de traverser les membranes cellulaires et ce par divers mécanismes dépendant du type cellulaire et du tissu biologique.

II-1 *Divalent Metal Transporter 1* (DMT1, DCT1, Nramp2 ou SLC11A2)

Quatre isoformes principales de DMT1 ont été identifiées jusqu'à présent (Hubert and Hentze, 2002). L'ARNm de deux d'entre elles contient un motif IRE (*Iron Responsive Element*) du côté 3' : leur traduction est favorisée par la fixation des protéines IRP (*Iron Regulatory Proteins*) sur ce motif. DMT1 est une protéine de la membrane plasmique permettant l'import de fer non héminique à travers certaines barrières biologiques comme lors de l'absorption intestinale du fer à la membrane apicale des entérocytes du duodenum. D'autres isoformes de DMT1 prennent en charge le transport du fer à travers la membrane endosomiale après sa libération du complexe transferrine-récepteur de la transferrine par acidification. Les propriétés de DMT1 en font un transporteur assez générique de cations métalliques divalents en association avec un symport de protons (Gunshin et al., 1997). Ainsi, **DMT1 est impliqué dans l'absorption du cadmium intestinal** (Tallkvist et al., 2001) car une répression de ce transporteur dans les entérocytes humains induit par un traitement riche en fer ou par extinction de l'ARNm de DMT-1 contenant un motif IRE de réponse au fer, (Bannon et al., 2003) provoque une diminution de l'entrée de fer et de cadmium. Au contraire une surproduction de DMT1 augmente fortement la concentration de cadmium intracellulaire (Bressler et al., 2004). Ainsi, l'augmentation de la traduction de DMT1 en cas de carence en fer permet une augmentation de la capacité d'absorption en fer et, par la même occasion, en cadmium. Cela explique pourquoi les femmes ayant des besoins accrus en fer, comme lors de gestations (Akeson et al., 2002), ou des patients anémiés aient une absorption de cadmium augmentée (Satarug et al., 2003). Ces situations conduisent à une accumulation de cadmium dans les cellules et donc une toxicité exacerbée de ce métal. Au contraire, si la diète redevient riche en fer, la quantité de cadmium absorbé diminue significativement ; ce processus d'absorption intestinale est donc au moins partiellement réversible (Ryu et al., 2004), sans

doute par le renouvellement rapide des villosités duodénales responsables de l'assimilation. La toxicité du cadmium dépend donc étroitement des réserves en fer de l'organisme et de la disponibilité de cet élément dans la diète.

Le variant d'épissage de DMT1 contenant le motif *Iron Responsive Element* est présent non seulement à la membrane apicale des entérocytes de l'intestin mais également dans le foie et les reins. **DMT1 est impliqué dans la réabsorption du cadmium sous forme ionique dans l'anse de Henle ainsi qu'au niveau du tubule distal** (Barbier et al., 2004). Cela est modulé en fonction du potentiel de membrane, du pH ainsi que du niveau d'expression de DMT1 (Olivi et al., 2001).

II-2 Les transporteurs du zinc

Le cadmium a la structure électronique $[\text{Kr}] 5s^2 4d^{10}$ qui peut se comparer à celle du zinc $[\text{Ar}] 4s^2 3d^{10}$. Ces deux éléments font ainsi partie de la même colonne du tableau périodique ce qui confère au cadmium certaines propriétés physico-chimiques semblables à celles du zinc. Cependant le zinc, contrairement au cadmium, est un métal indispensable en Biologie jouant des rôles structuraux, catalytiques et co-catalytiques, et dont l'homéostasie est précisément maintenue. Le mimétisme du zinc par le cadmium a des conséquences sur la perturbation de l'homéostasie du zinc. Plusieurs études mettent en évidence le rôle protecteur du zinc vis-à-vis de la toxicité du cadmium notamment dans les reins. En effet l'administration de zinc avant ou pendant celle du cadmium induit la synthèse des métallothionéines (paragraphe III-3a) ainsi que celle du glutathion (III-3c), deux entités permettant la prise en charge du cadmium et sa séquestration. Le zinc protège les fonctions rénales au cours d'une intoxication par le cadmium et ceci grâce à des mécanismes d'inhibition de l'apoptose (Jacquillet et al., 2006). Enfin, le zinc permet de réduire l'absorption du cadmium par compétition avec des sites d'entrée de ce toxique, comme cela a été montré dans une étude menée sur des souris déficientes en métallothionéines et dont les concentrations de zinc étaient trop faibles pour induire la synthèse de glutathion (Tang et al., 1998). Il s'avère donc légitime de considérer que le cadmium peut emprunter des voies d'entrée et de sortie propre au zinc. Nous allons examiner ces différentes possibilités.

✓ **Les protéines de la superfamille ZIP (*Zrt/Irt-like Proteins, SLC39*)** ont pour rôle la captation du zinc à partir du milieu extracellulaire ou des organites internes vers le cytosol, et assurent ainsi l'approvisionnement de la cellule en métal. Sur le plan structural, les prédictions montrent que cette famille possède huit domaines transmembranaires avec une topologie des extrémités C- et N- terminales du côté extracytoplasmique. Les protéines Zip ne contiennent pas de site de fixation pour l'ATP, ni de domaine ATPase. Quatorze protéines de la famille Zip ont été identifiées chez les mammifères (Cousins et al., 2006b); certaines d'entre elles sont tissu- et organite-dépendantes. Les protéines hZip1 et hZip2 localisées dans la membrane plasmique sont des transporteurs des cellules humaines permettant la captation du zinc à partir du milieu extracellulaire (Cousins et al., 2006b). Cependant il n'existe pas de preuve formelle que ces deux protéines permettent l'entrée de cadmium dans les cellules. Récemment, un nouveau transporteur d'intérêt pour la prise en charge du cadmium a été identifié : il s'agit de **Zip8**. La présence de ce transporteur à la membrane plasmique des cellules vasculaires endothéliales de testicules de souris conduit à une **augmentation de l'influx de cadmium**. Il en résulte une sensibilité exacerbée vis-à-vis du toxique (Dalton et al., 2005). Le transport de cadmium s'effectue de façon optimale à 37°C et pH 7.5 et dépend de la présence de carbonate. Le manganèse est le seul cation testé parmi une douzaine d'autres capable d'inhiber le transport de cadmium. **Il est donc suggéré que le manganèse soit le substrat physiologique de Zip8 qui fonctionnerait comme un symport d'HCO₃⁻** (He et al., 2006).

✓ En ce qui concerne l'efflux hors du cytosol, il existe dix membres de la famille des ZnT (*SLC30*) qui expulsent le zinc afin d'éviter un excès toxique de ce métal dans ce compartiment, ou qui alimentent certains organites en zinc. Cependant, le dogme selon lequel les protéines ZnT ne permettent que l'efflux du zinc hors du cytosol a été récemment remis en cause. En effet, le variant B de ZnT5, localisé à la membrane plasmique, contribue non seulement à l'efflux du zinc hors du compartiment cytosolique mais également à l'augmentation de zinc cytoplasmique lorsque l'expression de son gène est déclenchée dans des cellules Caco-2 (Valentine et al., 2007). Cette protéine pourrait donc fonctionner de manière bidirectionnelle comme observé par production hétérologue dans des oocytes de Xénope (Valentine et al., 2007). Les transporteurs ZnT interviennent aussi dans le stockage du zinc assurant un pool de zinc facilement mobilisable en cas de nécessité. Les similitudes de séquence entre les ZnT humaines sont très fortes et six domaines transmembranaires sont

prédits, à l'exception de ZnT5 pour lequel douze sont probables, avec une topologie des extrémités C- et N- terminales du côté cytoplasmique. Une boucle riche en histidine est soupçonnée être impliquée dans la fixation du zinc. Pour ZnT1,-2, -4 à 8, le transport de zinc a été confirmé, cependant le mécanisme de transport est encore inconnu. La plupart des ZnT est localisée dans des compartiments cellulaires et associée aux endosomes, à l'appareil de Golgi ou encore au réticulum endoplasmique. Le seul représentant présent de façon ubiquiste dans la membrane cytoplasmique est **ZnT-1**, ce qui s'accorde avec son rôle de régulation par efflux du zinc intracellulaire (Palmiter and Findley, 1995). En effet, la surexpression de son gène permet la survie de cellules BHK cultivées en présence de concentration élevée en zinc (300 μ M) (Palmiter, 2004). De plus ce gène est indispensable, car des souris homozygotes dépourvues de ZnT-1 ne sont pas viables (Langmade et al., 2000).

Le promoteur de ce gène contient deux éléments de réponse aux métaux ou MRE (Metal Responsive Element), qui fixent le facteur de transcription MTF-1 (voir plus loin), mais ne contient pas de boîte TATA. Alors qu'aucune évidence directe sur l'efflux du cadmium par ZnT-1 ou d'autres ZnT n'a été rapportée, l'expression du gène de ZnT-1 est rapidement induite via les éléments MRE par le zinc et le cadmium dans des viscères de l'endoderme d'embryon de souris et dans des lignées cellulaires fibroblastiques d'embryon de souris (Langmade et al., 2000), ainsi que dans des cellules cancéreuses de prostate humaine (Hasumi et al., 2003).

Récemment, **ZnT-1 a été proposé comme jouant un rôle dans l'entrée de cations divalents via les canaux calciques de type L (LTCC) (Ohana et al., 2006). Dans les neurones, le tissu cardiaque, ainsi que dans une lignée cellulaire ovarienne (Ohana et al., 2006) et une lignée issue d'une tumeur de glande médullo-surrénale de rat mâle, une répression de ZnT-1 permet l'augmentation de la perméabilité des canaux LTCC au calcium, au cadmium et au zinc (Segal et al., 2004).**

II-3 Les canaux calciques

Les canaux calciques, notamment voltage dépendants, sont hautement sélectifs pour le calcium; cependant le transport d'autres cations divalents comme le cadmium est possible dans certaines conditions. En effet, le cadmium possède un rayon ionique (0.99\AA) proche de celui du calcium (0.97\AA), ce qui lui permet d'emprunter certains de ces canaux. L'application d'antagonistes de canaux calciques tels que le diltiazem ou le verapamil inhibe l'entrée de cadmium dans les hépatocytes (Souza et al., 1997), ainsi que dans les cellules épithéliales du tubule distal (Friedman and Gesek, 1994) et les cellules médullo-surénales impliquées dans la libération de catécholamines (Kanthasamy et al., 1995). Bien que les flux calciques à travers les canaux voltage-dépendants soient inhibés par le cadmium (Shafer, 1998), il n'en demeure pas moins que le cadmium pénètre quand même à travers ces canaux calciques dans certains cas engendrant ainsi une toxicité (Hinkle et al., 1987). Les canaux qui semblent impliqués dans l'entrée de cadmium sont décrits ci-après.

✓ Canaux calciques de type T

Les canaux calciques de type T sont activés pour des potentiels de membrane faibles, ils possèdent une faible conductance, une cinétique d'inactivation rapide (courant transitoire : T) et une cinétique de désactivation lente. La désactivation d'un canal correspond au retour à l'état fermé d'un canal ouvert sans que celui-ci ne transite par un état inactivé. Ce type de canal est très fortement exprimé dans la plupart des régions du cerveau ainsi qu'à plus faible niveau dans le cœur, le placenta, les poumons et les reins. Trois sous-unités ont été identifiées : α_{1G} , α_{1H} et α_{1L} . **Une étude effectuée sur des fibroblastes murins ne possédant pas de métallothionéines a permis de mettre en évidence la sous unité α_{1G} d'un canal calcique de type T nommé $\text{Cacn}\alpha_{1G}$ dans l'entrée de cadmium.** La présence ou non de ce canal est responsable de la résistance de ces cellules vis-à-vis du cadmium (Leslie et al., 2006).

✓ Canaux calciques de type L

Les canaux calciques de type L sont activés pour de forts potentiels de membrane, possèdent une forte conductance et une cinétique d'inactivation lente. Ces canaux sont sensibles aux agonistes de type dihydropyridine. Les canaux calciques de type L représentent, entre autres, une voie d'influx de cadmium importante dans les cellules excitables comme les cellules

d'hépatocytes (Souza et al., 1997) ou les neurones (Usai et al., 1999). Dans les cellules pituitaires GH3, l'influx de cadmium à travers ces canaux représente seulement 1% de l'entrée de calcium, cependant ce pourcentage de cadmium est suffisant pour induire une toxicité qui est réduite en présence d'antagonistes de canaux calciques (Hinkle et al., 1992). Les trois classes d'antagonistes agissant sur trois sites distincts des canaux calciques de type L (nifédipine, verapamil et diltiazem) sont tous capables d'inhiber l'entrée de cadmium. Ces canaux sont également présents dans les cellules β -pancréatiques où ils sont responsables d'une accumulation importante de cadmium conduisant à l'apoptose, en comparaison de cellules épithéliales comme les HeLa qui ne possèdent pas de canaux calciques de type L (Gavazzo et al., 2005). Ce phénomène est atténué en présence de nimodipine, une dihydropyridine inhibitrice des canaux calciques de type L (Gavazzo et al., 2005). Enfin, plusieurs études effectuées aussi bien sur les rats que sur les humains ont montré qu'il existait un dimorphisme sexuel vis-à-vis de la toxicité du cadmium dans le foie qui se traduit par une accumulation de 50% de la dose de cadmium sous cutanée injectée pour les rats Sprague-Dawley femelles et de 33% pour les mâles (Baker et al., 2003). Ceci a également été vérifié pour les femmes dont le foie autopsié contenait 8.1 μg de cadmium par g de tissu sec contre 3.2 μg pour les hommes. La clé de l'explication serait l'implication de la progestérone qui, injectée aux rats mâles, provoque une forte augmentation de la toxicité du cadmium. Il semble donc que dans les hépatocytes de rat, la progestérone augmente la toxicité du cadmium et ceci via l'activation des canaux calciques ce qui entraîne un influx plus important de cadmium dans les cellules (Baker et al., 2003).

II-4 Les pompes d'efflux

✓ Multidrug Resistance Proteins

Une littérature abondante décrit les protéines de la famille des MRP (*Multidrug Resistance Proteins*) comme impliquée dans l'efflux de nombreux xénobiotiques. Leur surproduction est à l'origine de la résistance des tumeurs aux agents anticancéreux. Dans les tissus sains ces protéines ont un rôle protecteur vis-à-vis de l'accumulation de xénobiotiques et notamment des métaux lourds (Leslie et al., 2005).

Les protéines Mrp appartiennent à la superfamille des transporteurs ABC (ATP-binding cassette) responsables du transport actif à travers les membranes d'un large panel de

composés comme les phospholipides, stéroïdes, polysaccharides, anions organiques, cations métalliques etc...

Pour la plupart des transporteurs ABC, la liaison et l'hydrolyse de l'ATP qui s'ensuit, sur le domaine NBD (*nucleotide binding domain*), est requise pour fournir l'énergie nécessaire au transport du composé. Deux motifs localisés de part et d'autre de chaque NBD, désignés comme Walker A et Walker B, sont présents dans tous les transporteurs ABC ainsi que dans de nombreuses protéines liant l'ATP. Le motif Walker A de séquence G-X-X-G-X-G-K-S/T, où X est un acide aminé quelconque, présente une lysine impliquée dans la liaison du β -phosphate de l'ATP et le motif Walker B de séquence h-h-h-h-D-E-A/T-S-A-L-D, où h est un acide aminé hydrophobe, présente un résidu d'acide aspartique terminal dont la fonction acide carboxylique $-\text{COOH}$ interagit avec Mg^{2+} . Une troisième séquence d'acide aminé localisée entre les motifs de Walker A et B réfère à la signature propre aux transporteurs ABC. Il serait directement impliqué dans la reconnaissance, liaison et hydrolyse de l'ATP.

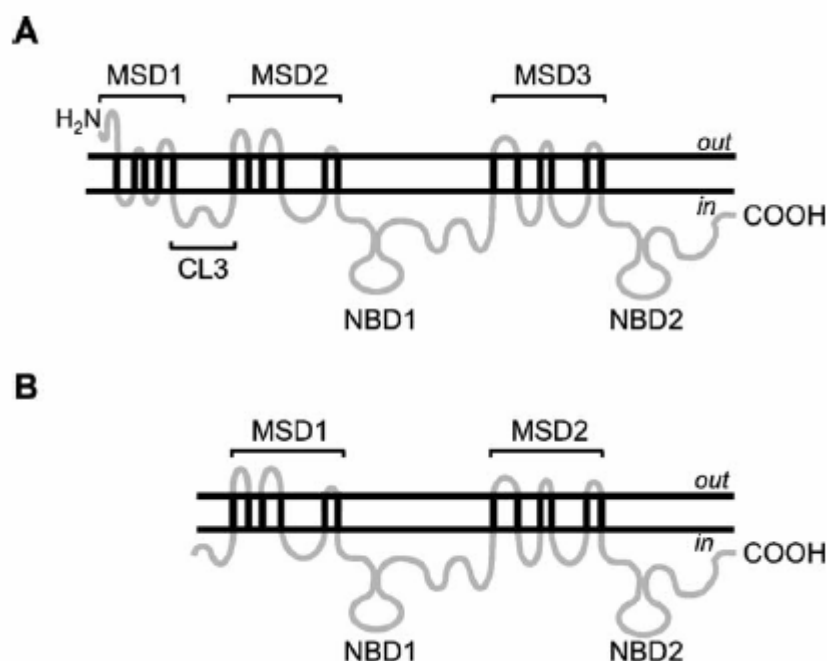


Figure 2 : Modèle topologique de structures secondaires prédites pour MRP1 et-2 (A) et la P-glycoprotéine (B). MSD, *membrane spanning domain*; NBD, *nucleotide binding domain*; CL, *cytoplasmic loop*. (Leslie et al., 2005)

La distribution tissulaire des transporteurs ABC chez l'homme tels que Mrp1 (ABCC1), Mrp2 (ABCC2) et la P-glycoprotéine (ABCB1) concorde avec la sensibilité de certains organes aux toxiques environnementaux et donc qui ont un besoin accru d'élimination ou de séquestration de ces toxiques. Les divers tissus où sont exprimés les trois transporteurs ABC sont répertoriés dans le tableau ci-dessous (Leslie et al., 2005).

Tissue	P-glycoprotein	MRP1	MRP2
Lung	apical	basolateral	not detected
Gut			
Duodenum	apical	basolateral	apical
Jejunum	apical	basolateral	apical
Ileum	apical	basolateral	apical
Colon	apical	basolateral	not detected
Liver	apical	basolateral (<i>v. low</i>)	apical
Kidney	apical	basolateral	apical
Brain			
BBB	apical	apical	apical
BCSFB	apical	basolateral	
Testis	apical	basolateral	not detected
Placenta	apical	basolateral	apical

La P-glycoprotéine (P-gp) est la pompe MDR (*Multidrug Resistance*) la mieux caractérisée. P-gp permet l'efflux préférentiel des composés hydrophobes et des molécules chargées positivement contrairement aux Mrp qui prennent en charge indifféremment les composés cationiques et anioniques. **L'expression de P-gp est proportionnelle à la concentration en cadmium dans les cellules intestinales Caco-2** (Huynh-Delerme et al., 2005) ; ceci est également observable pour des **cellules de tubules proximaux** de rat pour lesquelles la toxicité du cadmium diminue avec une augmentation de l'expression de P-gp (Thevenod et al., 2000). Dans ce cas ce sont les espèces réactives de l'oxygène, conséquence de l'exposition au cadmium, qui induisent la P-gp par un processus impliquant l'activation de NF- κ B (Thevenod et al., 2000). **Au niveau transcriptionnel, l'exposition au cadmium de cellules issues d'un adénocarcinome rénal conduit à une forte augmentation (de 7 à 8 fois) des ARNm de P-gp** (Chin et al., 1990).

Il existe également deux séquences consensus HSE (*Heat Shock Element*) présentes sur le promoteur du gène MDR1, sur lesquelles se fixe le facteur de transcription HSF (*Heat Shock Factor*).

Mrp1 et Mrp2 font parties des neuf Mrp actuellement connues, elles permettent l'efflux de toxiques conjugués au GSH (Swerts et al., 2006). Le glutathion semble avoir un rôle important dans l'efflux de toxiques par Mrp1. Ce transporteur interagit avec le glutathion par au moins quatre mécanismes distincts (Ballatori et al., 2005):

- Le GSH semble être un substrat de faible affinité, direct de Mrp1
- Le GSH est nécessaire dans le co-transport de certains substrats de Mrp1
- Le GSH stimule le transport de certains substrats de Mrp1, mais n'est lui-même pas transporté à travers la membrane
- Le transport du GSH peut être amélioré par certains composés non substrats de Mrp1.

Mrp1 est impliquée dans l'efflux des métaux lourds comme l'antimoine (Vernhet et al., 1999) permettant ainsi une résistance accrue des cellules pulmonaires à l'antimoine et l'arsenic.

Mrp2 est localisée aux membranes apicales de cellules polarisées et dans un nombre d'organes plus restreint que Mrp1. Mrp2 est elle aussi impliquée dans le transport du GSH et dans l'efflux du cadmium sous forme de complexes avec le GSH (GS-Cd-SG). **Mrp2 a été mis en évidence comme principal transporteur intervenant dans l'efflux de cadmium biliaire conjugué au GSH** (Paulusma et al., 1997), chez des rats Wistar TR⁻ (*transport deficient*), GroningenYellow (GY) et des rats Sprague-Dawley EHBR (*Eisai hyperbilirubinic*) dont la protéine Mrp2 n'était pas fonctionnelle due à une mutation (Ballatori et al., 2005). Ces rats sont par conséquent incapables de sécréter des anions organiques ainsi que le GSH ou des produits conjugués au GSH dans la bile suite à une injection intra veineuse de métaux. Ces rats présentent un phénotype similaire aux patients atteints du syndrome de Dubin-Johnson dont Mrp2 n'est pas fonctionnelle. **Chez les rats normaux, le cadmium est rapidement sécrété dans la bile, associé à une augmentation de quatre fois du GSH, tandis qu'il est indétectable dans la bile chez les animaux homozygotes pour la mutation de MRP2** (Ballatori et al., 2005; Dijkstra et al., 1996). Le processus d'excrétion est le même pour le zinc mais pas pour l'argent ; cela montre que Mrp2 permet l'efflux de cations divalents conjugués au GSH. De la même façon que pour Mrp1, le GSH est indispensable pour le transport de certains substrats par Mrp2, le GSH semble également impliqué dans le co-transport de métaux divalents et il stimule l'activité ATPase de Mrp2 (Ballatori, 2002).

II-5 Les transporteurs de manganèse

Nous avons vu précédemment (II-2) que le manganèse semblait être le substrat physiologique de Zip8 (He et al., 2006). Cependant, outre ce cas précis, d'autres systèmes impliqués dans l'influx du manganèse chez les mammifères semblent être également responsables de l'entrée de cadmium. Ainsi dans divers types cellulaires comme les cellules épithéliales HeLa, les ostéoblastes ou des cellules issues de tubules proximaux ou distaux de rein, une concentration de manganèse dix fois supérieure à celle du cadmium permet de bloquer son entrée (Martin et al., 2006a). Cela a aussi été mis en évidence grâce à l'utilisation d'une lignée cellulaire résistante vis-à-vis du cadmium développée à partir de fibroblastes d'embryons de souris déficientes en MT-I et -II et exposée au cadmium pendant une longue durée (Himeno et al., 2002). Dans la lignée résistante, il a été observé une diminution de l'incorporation de très faibles concentrations de manganèse aussi bien que du cadmium, ce qui suggère que **la suppression d'un transporteur de haute affinité du manganèse soit impliquée dans la résistance au cadmium** (Himeno et al., 2002). Des expériences d'incorporation compétitive ont révélé que **les deux métaux partagent la même voie d'entrée de haute affinité et que l'entrée optimale des deux métaux est obtenue à pH neutre** (Yanagiya et al., 2000). Ceci a également été observé dans les cellules HeLa, PC12 et Caco-2 (Yanagiya et al., 2000).

II-6 Récapitulatif des systèmes d'entrée et de sortie cellulaire du cadmium

Les différents candidats qui viennent d'être décrits comme pouvant être impliqués dans l'influx ou l'efflux cellulaire du cadmium sont répertoriés dans le tableau ci-dessous :

Candidats	Influx ou Efflux	Entité physiologique transportée	Référence	Type cellulaire ou organe
DMT1	Influx	fer	Gunshin (1997), Tallkvist (2001), Bannon (2003), Bressler (2004), Satarug (2003), Ryu (2004), Barbier (2004) et Olivi (2001)	Entérocytes, Foie et Rein
Zip 8	Influx	manganèse	Dalton (2005), He (2006)	Cellules endothéliales de testicules de souris
ZnT-1	Perméabilité aux canaux calciques de type L (Influx)	calcium et zinc	Ohana (2006) et Segal (2004)	Neurones, tissu cardiaque, lignée ovarienne et lignée médullo-surrénale murine
Sous unité $\alpha 1G$ d'un canal calcique voltage dépendant de type T	Influx	calcium	Leslie (2006)	Fibroblastes murins
Canaux calciques voltage dépendant de type L	Influx	calcium	Usai (1999), Souza (1997), Hinkle (1992), Gavazzo (2005)	Neurones Hépatocytes Cellules pituitaires Cellules β -pancréatiques
P-glycoprotéine	Efflux	Composés hydrophobes et chargés positivement	Huynh-Delerme (2005), Thevenod (2000)	Cellules intestinales et de tubules proximaux
MRP2	Efflux	Phospholipides, stéroïdes, anions organiques, cations métalliques etc...	Leslie (2005), Paulusma (1997), Ballatori (2005), Dijkstra (1996)	Au niveau du système biliaire chez les rats

III. Mécanismes de toxicité moléculaires du cadmium

Le cadmium appartient au groupe IIb de la classification de Mendeleïev. Dans les milieux biologiques il est présent sous le seul degré d'oxydation + II par perte de deux électrons s. Par conséquent il ne participe pas aux réactions d'oxydoréduction, y compris de type Fenton catalysant la transformation de l'oxygène en espèces très réactives (O'Brien and Salacinski, 1998), contrairement au fer ou au cuivre.

Le cadmium est un agent faiblement génotoxique mais dont les effets de toxicité sur les composants cellulaires sont très divers (Waisberg et al., 2003). **Le cadmium est en effet capable de moduler l'expression des gènes et la transduction du signal, il induit l'apparition d'espèces réactives de l'oxygène par des mécanismes indirects, il est décrit comme inhibiteur de la réparation de l'ADN et influe également sur les propriétés d'adhésion cellulaire** (Waisberg et al., 2003)...

Une des possibilités de toxicité importante du cadmium est celle **d'interférer avec des métaux essentiels comme le fer, le zinc ou le calcium dont les homéostasies sont finement ajustées par les cellules**. Ainsi les perturbations engendrées par la présence de cadmium aboutissent à des conséquences néfastes importantes pour la cellule. Je ne développerai pas davantage ce point qui a fait l'objet d'une revue intitulée « *Cadmium toxicity in animal cells by interference with essential metals* » écrite en collaboration avec A. Martelli, C Dycke, A Bouron et J-M Moulis.

III-1 Interférence avec l'homéostasie des métaux essentiels

Se référer à la publication mentionnée ci-dessus (annexe 1).

Les mécanismes de toxicité du cadmium par interférence avec l'homéostasie des métaux essentiels interviennent à plusieurs niveaux. Ce processus de toxicité est complexe du fait que le cadmium utilise les voies physiologiques dédiées à plusieurs autres métaux indispensables à la cellule. Comme **le cadmium ne possède aucune voie d'influx qui lui soit propre**, il peut utiliser celles du fer, de calcium ou de zinc, par exemple, comme il a été mentionné en partie II. De plus, comme ce toxique est difficilement excrété, son long temps de séjour dans la cellule lui permet d'interférer avec de nombreuses protéines dépendantes de métaux essentiels. Cela est illustré notamment par **l'interférence avec le zinc via certaines**

métalloprotéines comme les MT (III-3 a) sur laquelle le cadmium se fixe, ou bien sur les facteurs de transcription à doigts de zinc comme TFIIA (Hanas and Gunn, 1996; Huang et al., 2004) ou Sp-1 (III-3 e), bien que cela ait été mis en évidence uniquement *in vitro*. Le concept d'interférence entre zinc et cadmium via les protéines à zinc est également valable pour le calcium et de manière plus incertaine pour le fer, sinon dans le cas de DMT1 présenté en II-1. En effet, le cadmium modifie les signaux calciques intracellulaires, apportant un changement des stocks calciques internes avec des conséquences sur les voies de signalisation (III-5 f). Enfin, la dérégulation de l'homéostasie du fer par le cadmium peut éventuellement conduire à la production d'espèces réactives de l'oxygène (III-2 c).

III-2 Production d'Espèces Réactives de l'Oxygène par le cadmium

III-2 a Présentation du stress oxydant

Le stress oxydant est la conséquence d'un déséquilibre entre la production d'espèces réactives, le plus souvent dérivées de l'oxygène ou de l'azote, fortement oxydantes et leur destruction par des enzymes et autres molécules de défense anti-oxydante. Les espèces réactives de l'oxygène ou ROS sont des espèces intermédiaires dans la réduction à quatre électrons de l'oxygène pour former de l'eau. Leur apparition met en jeu un électron à chaque étape (Figure 3). Les principales enzymes intervenant dans la génération ou la conversion des espèces réactives de l'oxygène au cours de différentes étapes sont mentionnées sur le schéma ci-dessous.

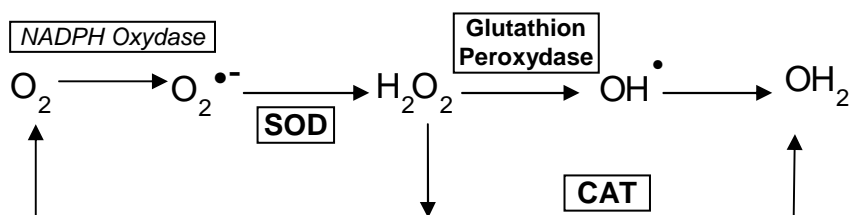


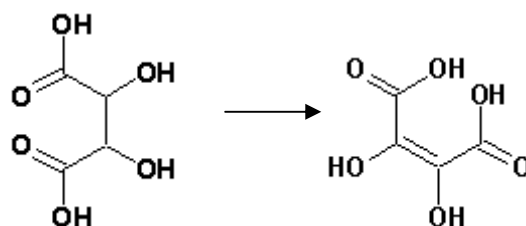
Figure 3 : Le radical superoxyde est la source de nouveaux ROS : le peroxyde d'hydrogène et le radical hydroxyle. Le superoxyde et le peroxyde d'hydrogène sont éliminés par la superoxyde dismutase (SOD) la glutathion peroxydase et la catalase (CAT).

Les radicaux libres sont des espèces chimiques qui possèdent un électron non apparié, ce qui les rend apte à réagir avec diverses molécules et engendre ainsi des dommages cellulaires importants comme c'est le cas pour le radical hydroxyle. Cependant la réactivité

des ROS est variable selon la nature du radical. Ainsi l'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$ n'est pas très réactif avec la plupart des molécules organiques, mais il constitue un précurseur activable.

Le radical superoxyde, $O_2^{\cdot-}$ est normalement produit chez les eucaryotes supérieurs par les macrophages (Bergendi et al., 1999) pour détruire les pathogènes lors de la phagocytose. Il est issu de la réduction de l'oxygène mettant en jeu un électron issu du NADPH et catalysée par un complexe enzymatique, la *NADPH oxydase*. Les macrophages et neutrophiles sont des acteurs cellulaires de l'immunité non spécifique et sont activés grâce à des attributs moléculaires qui les dotent d'une fonction de chimiotactisme. Ils sont alors attirés au foyer de l'infection où leurs récepteurs se lient aux oposines. Dans les neutrophiles au repos, en absence de phagocytose active, les composants protéiques de la *NADPH oxydase* sont répartis entre la membrane cytoplasmique et le cytosol. La membrane cytoplasmique contient deux flavocytochromes b558 : gp91^{phox} et p22^{phox} sous forme d'hétérodimères, plus une autre protéine Rap1A. Dans le cytosol sont présentes les protéines p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox} et Rac^{1,2}. Lorsque la *NADPH oxydase* est activée, les composants protéiques du cytosol migrent vers la membrane plasmique et s'assemblent autour des flavocytochromes afin de catalyser la réaction décrite Figure 3.

Le radical hydroxyle, OH^{\cdot} est une espèce extrêmement réactive. Il peut être généré par réduction de H_2O_2 catalysée par des métaux de transition capable de fournir facilement des électrons comme le fer II ou le cuivre I. Ce type de réaction a pris le nom de réaction de Fenton qui vient de la découverte en 1894 par Fenton qu'une quantité catalytique de fer transformait l'acide tartarique en acide dihydroxymaléique en présence de peroxyde d'hydrogène. La réaction est présentée ci-dessous :



Le radical hydroxyle réagit très rapidement avec les sucres, les acides aminés, les phospholipides, les nucléotides, etc... Il arrache un atome d'hydrogène aux molécules

organiques, en se fixant sur une double liaison carbonée. Sa durée de vie dans les compartiments cellulaires est très brève, ce qui le rend difficilement détectable.

Les dommages liés à un stress oxydant se traduisent par diverses altérations, telles que l'oxydation de l'ADN (Gate et al., 1999), des protéines (Hawkins and Davies, 2001; Requena et al., 2001; Stadtman and Berlett, 1997; Thannickal and Fanburg, 2000) ou encore la peroxydation des lipides (Gate et al., 1999; Yuan and Brunk, 1998).

III-2 b Mécanismes anti-oxydants

Les antioxydants efficaces sont ceux qui empêchent la formation d'espèces oxygénées activées : ce sont notamment les enzymes détruisant H_2O_2 avant son utilisation dans des réactions de Fenton, ou encore de précurseurs d'espèces chlorées (Gate et al., 1999).

➤ Les Superoxydes dismutases (SOD)

Ce sont des métallo-enzymes qui accélèrent considérablement la vitesse de dismutation de $O_2^{\bullet -}$ en H_2O_2 (de trois ordres de grandeur). La superoxyde dismutase abrège l'existence de l'anion superoxyde et évite sa réaction avec NO^{\bullet} , pour former un oxydant efficace : le peroxynitrite; elles empêchent aussi l'accumulation de cette espèce dans les membranes, en même temps que celle de l'anion superoxyde. Il existe différentes isoformes de SOD. Le mécanisme réactionnel est catalysé par un métal situé au site actif de l'enzyme et dont la nature permet la distinction des différentes SOD. Les deux premières (CuZn-SOD et Mn SOD) sont présentes chez les eucaryotes ainsi que quelques procaryotes. La SOD à cuivre-zinc (CuZn-SOD) possède deux sous-unités identiques, le site métallique est dinucléaire et formé de trois ligands histidine trigonaux qui coordonnent le Cu^{II} ainsi qu'un quatrième ligand histidine oxydé permettant le pontage avec le $zinc^{II}$ relié à deux histidines et un acide aspartique (Banci et al., 1998). Les CuZn-SOD sont présentes soit dans le cytosol (cCuZn-SOD), soit situées sur la face externe de la membrane des cellules endothéliales (ecCuZn-SOD) ou encore dans les lysosomes. Il existe également une forme excrétée (pCuZn-SOD) (Kaynar et al., 2005). La SOD à manganèse et à fer sont homologues avec un atome de fer ou de manganèse coordonné par trois résidus histidine et un acide aspartique ainsi qu'une molécule de solvant. La Mn-SOD protège les procaryotes et les mitochondries dans les cellules eucaryotes (Fridovich, 1998) au contraire de la Fe-SOD présente uniquement chez les

procaryotes et chez quelques plantes vertes. Enfin la SOD à nickel est présente chez *Streptomyces* et les cyanobactéries (Barondeau et al., 2004).

➤ Catalase

La catalase dismute le peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène (Fridovich, 1998). C'est une enzyme tétramérique, chaque unité portant une molécule d'hème (complexe fer-porphyrine) dans son site actif et utilisant le NADPH comme cofacteur. La catalase est présente dans les globules rouges ainsi que dans les peroxysomes des tissus à métabolisme élevé : foie, coeur, rein, rate et poumons (cellules alvéolaires).

➤ Glutathion peroxydase

Les glutathion peroxydases utilisent non seulement le peroxyde d'hydrogène, mais également des peroxydes organiques tels que les lipoperoxydes comme substrats. Le fonctionnement des glutathion peroxydases exige un flux de glutathion réduit. Cela est possible grâce à la coopération de plusieurs enzymes dont la glutathion réductase qui réduit le glutathion oxydé (GSSG) en consommant du NADPH (Meister, 1994).

Ces enzymes ont en commun une structure tétramérique dont chaque monomère possède un atome de sélénium dans son site actif, fortement fixé à la chaîne peptidique car il est incorporé sous forme de sélénocystéine. Outre les globules rouges, de nombreux types cellulaires l'abritent et notamment les monocytes qui sont de gros producteurs d'H₂O₂. La GSH peroxydase possède un rôle très important dans les mitochondries dont le niveau de peroxyde d'hydrogène peut être très élevé. Dans ces organites, la catalase est absente et la prise en charge du peroxyde d'hydrogène dépend alors uniquement de la GSH peroxydase (Meister, 1994).

➤ Systèmes antioxydants organisés autour des thiorédoxines et glutarédoxines

Le système thiorédoxine rassemble le NADPH, la thiorédoxine et la thiorédoxine réductase. La thiorédoxine réductase de mammifère est une sélénoprotéine contenant un résidu sélénocystéine essentiel à son activité catalytique. Trois isoenzymes de la thiorédoxine réductase ont été identifiées chez les mammifères: une forme cytosolique (TrxR1), une forme

mitochondriale (TrxR2) et une troisième localisée principalement dans les testicules. Les thiorédoxines sont de petites protéines (12kDa) capables de réduire les liaisons disulfures des protéines oxydées et de leur restituer leur conformation. Une fois oxydée, la thiorédoxine est réduite par la thiorédoxine réductase (Figure 4). Ce système contribue au maintien du statut redox de la cellule en synergie avec un autre système : le système glutarédoxine.

Ce système est composé de NADPH, de glutarédoxine ainsi que de la glutarédoxine réductase et de glutathion. La glutarédoxine, tout comme la thiorédoxine, permet la réduction des ponts disulfures (Figure 4) mais aussi des monothiols conjugués au glutathion de la forme R-S-SG (Holmgren et al., 2005). Ce système permet également le maintien du pool de glutathion réduit.

D'autres candidats participent à l'équilibre redox de la cellule comme par exemple les vitamines E, C et A etc...

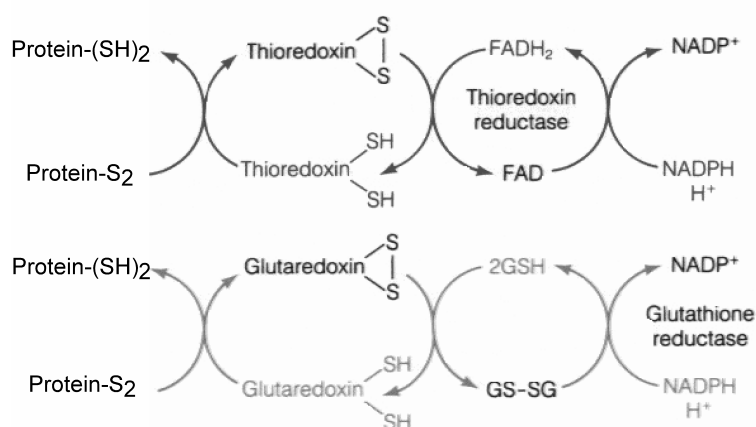


Figure 4 : Cycles des systèmes antioxydants impliquant la thiorédoxine (en haut) et la glutarédoxine (en bas).

III-2 c Effet du cadmium sur la production de ROS

Le cadmium n'est pas un métal redox et donc ne catalyse aucune réaction de type Fenton : il ne peut pas générer directement d'espèces réactives de l'oxygène. Cependant de nombreuses études ont démontré que la présence de cadmium induisait la production d'espèces réactives de l'oxygène comme les radicaux hydroxyles ou le peroxyde d'hydrogène, que ce soit dans des lignées cellulaires épithéliales HeLa, d'aorte bovines (Szuster-Ciesielska et al., 2000), de thymocytes et lymphocytes murins (Pathak and

Khandelwal, 2006a; Pathak and Khandelwal, 2006b) ou bien *in vivo* dans des rats (Shaikh et al., 1999), ainsi que la peroxydation lipidique dans le foie et les reins de rats (Hirano et al., 1997) et de cochon d'Inde (Shaikh et al., 1999; Stohs and Bagchi, 1995). Le cadmium est aussi impliqué dans les cassures de l'ADN responsables de la mort par apoptose, très probablement via la production de ROS comme cela a été décrit dans divers types cellulaires (Liu and Jan, 2000; Mouron et al., 2001; Pathak and Khandelwal, 2006b). La production de ROS par le cadmium est également détectable par l'induction de facteurs de transcription sensibles au statut redox de la cellule comme AP-1 ou NF-κB (Hart et al., 1999).

Les divers mécanismes conduisant à une augmentation de ROS par le cadmium ne sont pas totalement élucidés ; toutefois diverses causes de production de ROS par le cadmium peuvent être proposées.

Tout d'abord, **des expositions courtes au cadmium semblent inhiber les enzymes intervenant dans le maintien de l'équilibre redox comme la SOD** (Stohs and Bagchi, 1995), **la CAT ou la GSH peroxydase** (Szuster-Ciesielska et al., 2000), **au contraire des expositions prolongées où les activités enzymatiques sont alors accrues** (Potts et al., 2001; Waisberg et al., 2003), probablement à cause d'une adaptation suite à l'induction des gènes codant pour ces enzymes. Des études utilisant des ARN interférentiels dirigés contre la thioredoxine réductase 1 (cytosolique) sur des cellules HeLa ont montré que, pour de faibles concentrations ($< 10 \mu\text{M}$) de cadmium, cette enzyme permet un maintien de la viabilité cellulaire, tandis que pour des concentrations plus importantes sa présence n'aide pas la survie cellulaire (Nishimoto et al., 2006).

L'apparition des ROS en présence de cadmium, ainsi que de nombreux autres effets, s'expliquent facilement par **une forte diminution de thiols libres, pour lesquels le cadmium possède une forte affinité**. Cet effet concerne particulièrement le glutathion qui joue un rôle antioxydant dans l'inactivation directe des ROS ou via la GSH peroxydase. De même les thiorédoxines cytosoliques et mitochondriales sont oxydées après exposition au cadmium (Hansen et al., 2006), ce qui peut être dû soit à une interférence directe du cadmium avec les thiols libres des thiorédoxines, soit à l'effet des ROS.

Une autre possibilité purement hypothétique mais envisageable aidant à expliquer une augmentation des ROS en présence de cadmium est le déplacement du fer ou du cuivre de divers sites intracellulaires (Stohs and Bagchi, 1995), suivi d'une redistribution entraînant une augmentation de la concentration locale de ces métaux sous une forme réactive et qui agissent

via la réaction de Fenton (Waisberg et al., 2003). Il a été montré qu'en présence d'un complexe cuivre-métallothionéine, le cadmium génère des radicaux hydroxyles. Le déplacement du cuivre par le cadmium dans la protéine serait une illustration de ce principe (O'Brien and Salacinski, 1998).

Une étude visant à élucider le mécanisme de résistance de cellules épithéliales alvéolaires de type II vis-à-vis du cadmium a montré que contrairement aux cellules parentes, les cellules résistantes possédaient des activités antioxydantes amplifiées, **une réduction des cassures de l'ADN vis-à-vis d'un stress oxydant accompagnée d'une augmentation de 7,8-dihydro-8-oxoguanine signifiant l'inhibition du système de réparation de l'oxydation de l'ADN par le cadmium** (Potts et al., 2001; Potts et al., 2003). Ceci a également été montré dans divers systèmes cellulaires comme les testicules de rat (Hirano et al., 1997) ou des lignées ovariennes de hamster (CHO) (Fatur et al., 2003). Dans ce dernier cas l'effet génotoxique du cadmium a été mis en évidence ; en effet, les cellules ont été pré-incubées avec du cadmium puis soumises à une exposition UV, et les systèmes de réparation de l'ADN se sont révélés totalement inefficaces (Fatur et al., 2003). Ceci a été confirmé en montrant que **l'activité de OGG1 (8-oxoguanine-DNA glycosylase), enzyme permettant l'excision de la 7,8-dihydro-8-oxoguanine de l'ADN, était inhibée (Hart et al., 2001; Potts et al., 2003)**. Cette modification est d'importance car elle conduit au remplacement de l'appariement G : C par T : A et contribue à l'effet co-mutagène du cadmium.

Le cadmium interfère donc majoritairement avec les systèmes antioxydants, cause d'une augmentation de ROS dans la cellule et de cytotoxicité. Une augmentation de ROS ne porte pas uniquement préjudice aux matériels cellulaires mais influe également sur l'expression des gènes car les ROS peuvent agir comme molécules de signalisation.

III-2 d Les ROS : signaux moléculaires

L'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène fonctionnent comme des messagers intracellulaires que ce soit chez les bactéries, les plantes ou les animaux (Thannickal and Fanburg, 2000). Chez les mammifères, le peroxyde d'hydrogène induit la phosphorylation des protéines kinases C (Finkel, 1998) déclenchant ainsi la phosphorylation de diverses protéines comme celles impliquées dans la cascade de signalisation des MAP kinases (Sauer et al.,

2001). Les ROS modulent donc les signaux transmis et les réponses de cibles comme les facteurs de transcription (Thannickal and Fanburg, 2000). Deux exemples bien représentatifs suffisent à illustrer le rôle de messagers des ROS, via deux mécanismes distincts, et sont assez bien connus, même si certains points obscurs demeurent. Le premier mécanisme présente une régulation qui s'effectue par la phosphorylation de I κ B tandis que le second présente la régulation de Hif-1 α via l'hydroxylation.

Tout d'abord, le peroxyde d'hydrogène agit sur le facteur de transcription NF- κ B. Une des fonctions biologiques du peroxyde d'hydrogène est d'activer la translocation nucléaire de NF- κ B (Gate et al., 1999) qui permettra ultérieurement la transcription de gènes impliqués dans la défense contre le stress oxydant comme ceux des SOD, glutathion transférase ou NOS (*nitric oxide synthase*) ainsi que d'autres impliqués dans les mécanismes d'inflammation, d'adhésion cellulaire ou encore de réponses aux pathogènes. Dans la plupart des cellules, NF- κ B est présent sous forme d'hétérodimère inactif dans le cytosol. Dans des conditions normales, la sous-unité p65 qui possède une activité transcriptionnelle est associée à une sous-unité inhibitrice I κ B qui empêche la translocation de NF- κ B vers le noyau. Sous l'action de stimuli tels que le peroxyde d'hydrogène, I κ B est phosphorylé et se détache du complexe. La translocation nucléaire de NF- κ B s'effectue alors et le facteur de transcription peut se lier aux séquences d'ADN qu'il reconnaît.

Un autre exemple caractéristique est celui du facteur de transcription, Hif-1 (*hypoxia inducible factor*) qui est régulé de manière redox dépendante (Finkel, 1998) ; en condition d'anoxie ou de réduction de la concentration d'oxygène (hypoxie) Hif-1 permet l'induction des gènes notamment de l'érythropoïétine et VEGF (*vascular endothelial growth factor*). Hif-1 est constituée de deux sous-unités α et β . La sous-unité β possède une durée de vie constante tandis que celle de la sous-unité α dépend du taux d'oxygène. En condition de normoxie, la sous-unité α est hydroxylée sur une de ses prolines, ce qui déclenche l'ubiquitinylation de la protéine puis sa dégradation par le protéasome (Salceda and Caro, 1997). La transcription des gènes cibles n'a pas lieu. En condition d'hypoxie, la sous-unité α reste intacte et n'est donc pas éliminée. Elle forme un dimère avec la sous-unité β qui permet la transcription des gènes responsables de l'adaptation à l'hypoxie.

III-3 Effets du cadmium sur la régulation des gènes

III-3 a Induction des métallothionéines (MT)

Les MT sont des protéines de faibles masses moléculaires (6 kDa), riches en cystéines (30% de cystéines, pas d'acide aminé aromatique, ni d'histidine), ce qui leur permet de complexer les cations métalliques par les groupements thiols et ainsi d'avoir une teneur importante en métal. Les métallothionéines diminuent ainsi la disponibilité du cadmium dans la cellule ce qui réduit sa toxicité (Beattie et al., 2005).

Elles sont caractérisées par la présence de motifs Cys – X – Cys, Cys – X – X – Cys, où X est un acide aminé autre que la cystéine, et de cystéines vicinales. La chaîne polypeptidique forme deux domaines globulaires appelés α et β . La MT peut lier jusqu'à sept atomes de cuivre, de zinc ou de cadmium. Le domaine α lie 4 atomes de métal alors que β en lie 3 (Figure 5). En présence de cadmium, il se produit une redistribution des atomes de zinc préférentiellement sur la chaîne β .

Les MT sont fortement induites suite à l'exposition des cellules aux métaux comme le zinc ou le cadmium, ainsi que par des xénobiotiques ou des agents oxydants (Beyersmann and Hechtenberg, 1997). Elles jouent également un rôle crucial quant à la régulation de l'homéostasie du zinc dans la cellule (Klaassen et al., 1999). Elles sont ubiquitaires dans le règne animal et l'homme possède 4 gènes de MT tous situés sur le chromosome 16 bien que la majeure partie des tissus n'expriment que deux isoformes MT-1 et MT-2. L'expression de MT-3 est spécifique du cerveau et de manière moindre dans le pancréas et dans l'intestin (Ebadi et al., 1995) et celle de MT-4 est limitée aux épithéliums tels que celui de la peau ou de la langue (Quaife et al., 1994).

Les séquences capables de réguler l'activité transcriptionnelle des gènes de métallothionéines sous l'effet d'ions métalliques sont appelées MRE (*Metal Responsive Element*) dont la séquence consensus de huit nucléotides est CTCTGCRNCGGCCC, où R représente A ou G, et N représente l'un des quatre nucléotides. Les séquences régulatrices des gènes de métallothionéines contiennent également une région de type « GC box » (GGGGCGGGG) sur laquelle se fixe le facteur de transcription Sp1 (Karlseder et al., 1996) permettant ainsi d'augmenter l'efficacité de la transcription (III-3 e).

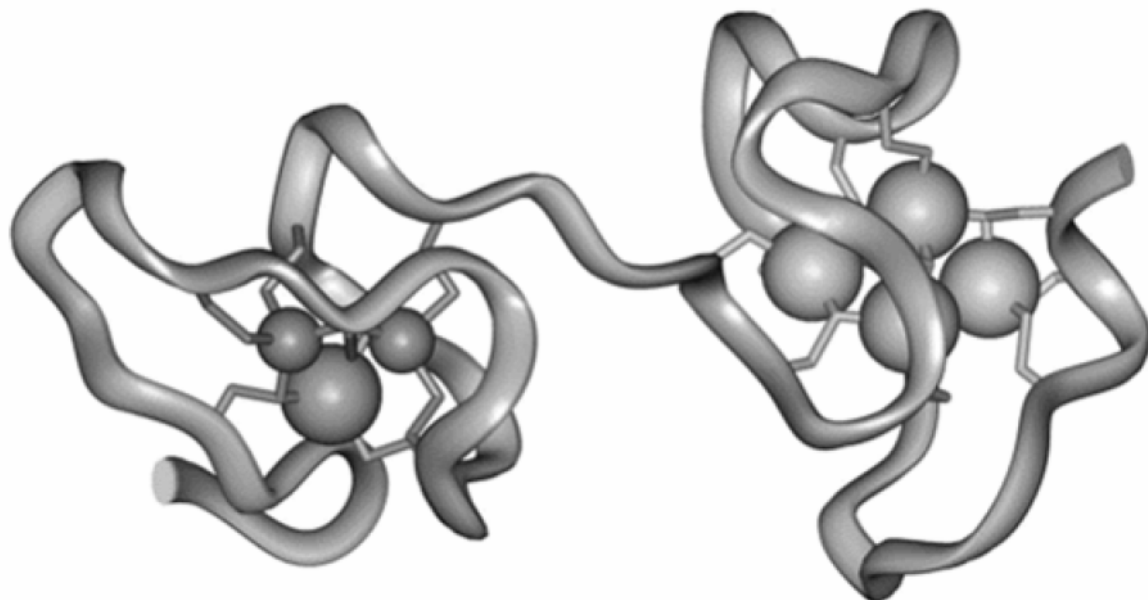


Figure 5 : Structure tridimensionnelle de métallothionéine chez le rat. Les sphères représentent les ions métalliques fixés par les résidus cystéines (adaptée d'après (Romero-Isart and Vasak, 2002))

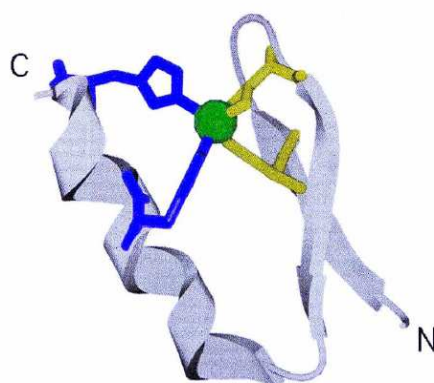


Figure 6 : Structure tridimensionnelle d'une portion de MTF-1 mettant en évidence le doigt de zinc composé de deux cystéine (en jaune) et deux histidine (en bleu) formant une coordination tétraédrique avec le zinc (II). (Giedroc et al., 2001)

L'organisation des séquences de régulation des gènes des métallothionéines est caractérisée par la forte densité d'éléments capables d'induire la transcription. Outre les multiples motifs de type MRE sur lesquels se lie MTF-1 (III.-3b), il existe une autre région répondant à la stimulation par des hormones stéroïdes appelée GRE (*Glucocorticoid Responsive Element*) qui permet une augmentation du taux de transcription des gènes de métallothionéines en cas de stimulation hormonale. Il existe également **une région répondant aux radicaux libres et autres agents oxydants appelés ARE (*Antioxidant Responsive Element*) sur laquelle se fixe la protéine leucine zipper (structure hélice-boucle-hélice) USF (*Upstream Stimulatory Factor*) en réponse, entre autres, au cadmium et au peroxyde d'hydrogène.** Le promoteur de MT-I de souris contient en effet une séquence consensus ARE qui se superpose avec un site de liaison d'USF. **Ce motif USF/ARE répond directement à l'application de cadmium mais pas de zinc.** La délétion de ce motif dans la MT-1 de souris réduit de moitié la réponse au cadmium (Andrews, 2000). De plus la fixation au motif USF/ARE permet d'augmenter ou de prolonger spécifiquement la réponse de la MT-I vis-à-vis du cadmium et par rapport au zinc.

III-3 b *Metal-responsive element-binding transcription factor-1* (MTF-1)

La structure de MTF-1 est bien conservée (Otsuka, 2001). C'est une protéine possédant six doigts de zinc Cys₂-His₂ (Figure 6) qui se fixe sur les motifs MRE de l'ADN de la MT, de ZnT-1 ou de la chaîne lourde de la γ -glutamylcystéine synthétase. MTF-1 est régulé positivement par le zinc uniquement, bien que le cadmium induise l'expression des gènes de la MT. La liaison de hMTF-1 au motif MREa est spécifique d'une séquence consensus TGCRCNC. MTF-1 humaine possède également un variant appelé ZRF (*Zinc Regulatory Factor*) décrit dans les cellules HeLa mais ne différant de hMTF-1 que d'un acide aminé dans le second motif à doigt de zinc (Koizumi et al., 1999) (Figure 7). hMTF-1 et ZRF activés par le zinc se fixent sur quatre des sept motifs MRE présents sur le gène de la MT-IIA humaine.



Figure 7 : Représentation schématique de hMTF-1 (humain), mMTF-1 (souris) et fMTF-1 (poisson). La conversion de l'histidine 185 en tyrosine dans ZRF est indiquée par la flèche (Giedroc et al., 2001).

MTF-1 est produit de façon constitutive dans le cytoplasme et est activé par fixation du zinc. Cette activation se traduit par une translocation de la protéine au noyau puis par sa fixation à l'ADN (Smirnova et al., 2000). Que ce soit dans des cellules humaines (HeLa) ou murines (Hepa), la présence de cadmium n'accroît pas l'activité fixatrice de MTF-1 à l'ADN contrairement au zinc. Des études effectuées sur la protéine MTF-1 recombinante humaine et murine ont montré qu'il semblerait même que le cadmium inhibe la fixation de MTF-1 sur

l'ADN par interaction avec ses doigts de zinc et que MTF-1 est protégée de cette inhibition une fois fixée à l'ADN (Bittel et al., 1998). **Le mécanisme d'induction de la fixation de MTF-1 sur l'ADN par le cadmium s'effectue par une redistribution du zinc dans la cellule car le cadmium possède une meilleure affinité pour les MT que le zinc (Figure 8).** Le zinc ainsi délocalisé active MTF-1 (Zhang et al., 2003). Au contraire, la présence de thionéines, la forme apo-protéique de la MT, inhibe l'activation de MTF-1.

Un autre mécanisme proposé est celui de la phosphorylation de MTF-1 qui joue un rôle critique dans son activation par le zinc et le cadmium. Une augmentation de la phosphorylation de MTF-1 est observée suite à l'exposition au cadmium et au zinc, suivie de la délocalisation de MTF-1 au noyau et de son accumulation (Saydam et al., 2002).

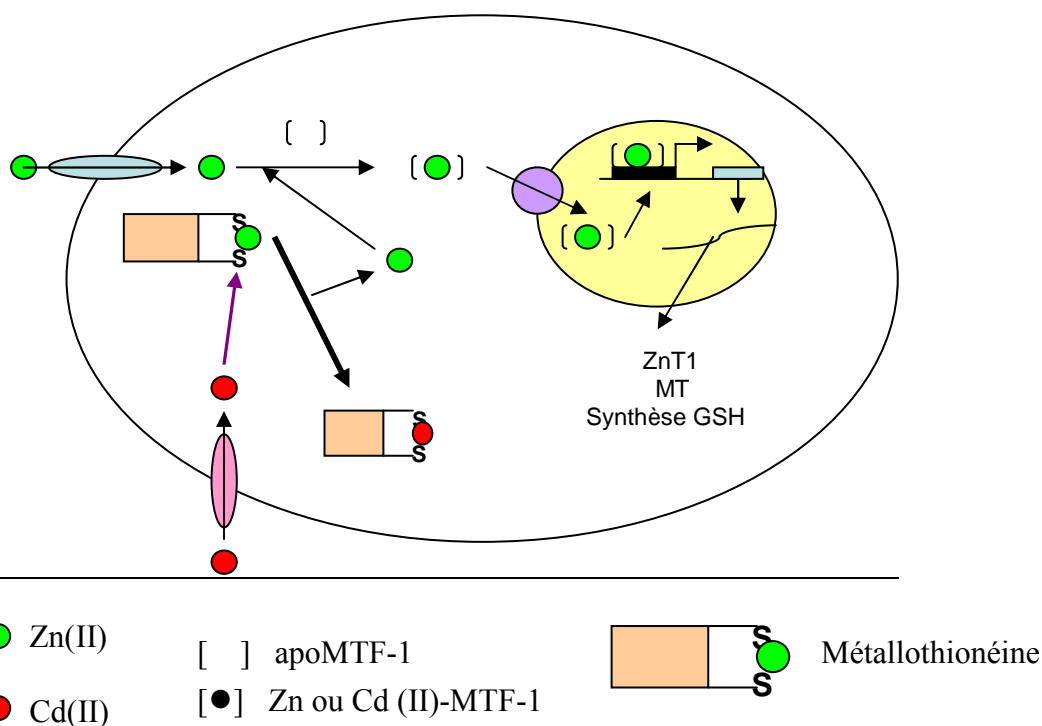


Figure 8: Modèle illustrant l'activation de MTF-1. MTF-1 est activée suite à la liaison du zinc, subit une translocation au noyau et se fixe sur les motifs MRE de l'ADN des gènes de la MT, ZnT-1 et la γ -glutamylsynthétase. Sur ce modèle, l'activation de MTF-1 par le cadmium s'effectue via un mécanisme indirect dans lequel le cadmium déplace le zinc des MT. Le zinc ainsi libéré peut venir activer MTF-1.

III-3 c Induction de la synthèse du glutathion

La métallothionéine n'est pas la seule molécule importante dans la prise en charge cellulaire du cadmium, le GSH joue également un rôle proéminent. La synthèse de ce tripeptide de séquence γ -glutamate-cystéine-glycine, est régulée par l'activité de la γ -glutamylcystéine-synthétase. Le glutathion est majoritairement présent sous forme réduite GSH dans les cellules non stressées mais existe également sous la forme oxydée GSSG. GSSG est réduit par la glutathion réductase (III-2b). Le glutathion tout comme la glutathion réductase participe donc au maintien du statut redox de la cellule et sert de substrat à de nombreuses enzymes impliquées dans la défense cellulaire (III-2b). La glutathion-S-transférase intervient dans la conjugaison du GSH aux xénobiotiques afin d'augmenter leur caractère hydrophile avant élimination. Le rôle de GSH est multiple et il peut aussi se lier aux MT (Brouwer et al., 1993).

De faibles concentrations de cadmium non cytotoxiques augmentent la concentration en GSH dans divers types cellulaires comme les thymocytes et lymphocytes murins (Pathak and Khandelwal, 2006a) ou encore les cellules mésangiales de rein de rat ou encore les macrophages péritonéaux de souris (Beyersmann and Hechtenberg, 1997). **En effet, la synthèse du glutathion induite par la présence de faibles doses de cadmium permet à la cellule de mettre en place des mécanismes de défense alors qu'aux fortes concentrations de toxique, les systèmes anti-oxydants sont submergés et la synthèse du GSH diminue.**

Il a été montré que le cadmium à faibles concentrations, pouvait induire la transcription des gènes de la γ -glutamylcystéine synthétase et des glutathion-S-transférases (GST- α et GST- π) qui contiennent des motifs MRE (III-3b). La biosynthèse accrue de GSH en présence de cadmium serait un mécanisme de protection dans lequel le cadmium se fixe aux groupements thiols du GSH, ce qui prévient contre des dommages cellulaires, comme cela a été décrit dans des fibroblastes pulmonaires humains résistants au cadmium par comparaison aux cellules d'origine (Hatcher et al., 1995).

L'exposition de cellules épithéliales alvéolaires au cadmium crée un état pro-oxydant qui, dans un premier temps, induit une diminution du pool de GSH, suivi de l'augmentation de synthèse du GSH. Le mécanisme susceptible d'induire la synthèse accrue de GSH implique l'activation par le cadmium de la transcription des gènes de la γ -glutamylcystéine synthétase et des glutathion-S-transférases α et π (Shukla et al., 2000). Le GSH joue donc un rôle important dans la toxicité du cadmium.

III-3 d Induction de l'hème oxygénase-1

L'hème oxygénase est une enzyme de 32 kDa permettant la dégradation des hèmes en biliverdine qui est convertie en bilirubine par la biliverdine réductase. Il existe deux isoformes bien caractérisées : HO-1, la forme inductible, et HO-2, la forme constitutive. Une troisième, distincte de HO-1 mais partageant 90% d'identité de séquence avec HO-2, a aussi été décrite. HO-1 est exprimée de façon ubiquitaire dans les cellules mammifères, et plus particulièrement dans la rate, lieu de destruction des érythrocytes sénescents, et donc de l'hémoglobine qu'ils contiennent. HO-1 est induite par divers stimuli comme l'hème, certaines espèces réactives de l'oxygène et de l'azote, des facteurs de croissance, l'hypoxie, l'hyperoxie, et le cadmium (Sikorski et al., 2004). De nombreux effets protecteurs de HO-1 ont été rapportés, attribuable aux produits de dégradation de l'hème par l'HO-1, comme la bilirubine qui permet de piéger les radicaux et d'inhiber la peroxydation lipidique (Stocker et al., 1987). Cependant si le substrat, c'est à dire l'hème, est présent en quantité trop importante, l'HO-1 induit des effets néfastes pour la cellule comme une émission massive de monoxyde de carbone et de fer (Sikorski et al., 2004). De nombreux sites de liaison pour divers facteurs de transcription (NF- κ B, AP-1, AP-2, Sp1, USF...) sont présents sur la région promotrice du gène de HO-1 (Sikorski et al., 2004).

Chez l'Homme, le gène de HO-1 a été identifié sur le chromosome 22 avec un motif de séquence TGCTAGATTT nommé *Cadmium Responsive Element* (CdRE) dans la région promotrice répondant fortement au cadmium dans les cellules HeLa (Takeda et al., 1994). Ceci a également été montré dans les cellules épithéliales rénales humaines (Sikorski et al., 2006). Ce motif du gène de l'HO-1 n'est pas sensible au zinc et les protéines nucléaires reconnaissant ce motif ne se fixent pas sur les séquences MRE (Takeda et al., 1995). Très récemment, la protéine *Pescadillo* (PES1), identifiée à l'origine chez le poisson zèbre *Danio rerio* et impliquée dans le développement embryonnaire, a été mise en évidence comme étant une des protéines nucléaires capable de s'associer au motif CdRE *in vivo* et *in vitro*. Au troisième jour de l'embryogenèse, les poissons zèbres PES1^{-/-} ont un cerveau réduit, de plus petits yeux ainsi que des nageoires plus réduites que les embryons non déficients en PES et pas d'extension de la mâchoire (Allende et al., 1996).

La protéine Pes1 régulerait l'activité du promoteur de HO-1 dans les cellules épithéliales rénales en présence de cadmium (Sikorski et al., 2006). Cependant le mécanisme moléculaire

de régulation du gène d'HO-1 par *Pescadillo* n'est pas entièrement connu ainsi que les protéines qui lui sont associées.

L'activation du gène HO-1 par le cadmium s'effectue également via l'augmentation de la demi-vie de Nrf2, qui est normalement dégradée rapidement par le système ubiquitine-protéasome (Stewart et al., 2003), ainsi que par la fixation du facteur de transcription USF (III-3 a) sur le site de liaison USF de son promoteur. Cette réponse est induite par le cadmium et non par l'hème. L'initiation de la transcription du gène de HO-1 par le cadmium semble résulter d'une altération structurale par le cadmium des deux sous-unités du facteur de transcription USF (Maeshima et al., 1996).

III-3 e Suppression de l'activité de Sp1 (*Specificity protein 1*)

Sp1 est un facteur de transcription à doigts de zinc ubiquitaire qui intervient dans la prolifération, le cycle cellulaire (Karlseder et al., 1996) et l'apoptose (Watkin et al., 2003). Le cadmium provoque la suppression de l'activité de Sp1 dans des cellules épithéliales alvéolaires de rats et ce proportionnellement à la dose et la durée de l'exposition. Plusieurs mécanismes peuvent expliquer cette inhibition : par modification redox (la présence d'antioxydant diminue l'inhibition), par phosphorylation par le cadmium ou par protéolyse (Watkin et al., 2003).

Dans des lignées cervicales et fibroblastiques humaines, l'exposition à de faibles concentrations de cadmium diminue l'expression de hOGG1 (*8-oxoguanine-DNA glycosylase-1*) via une diminution de la fixation de Sp1 au promoteur de OGG1 qui contient plusieurs sites putatifs de fixation de Sp1 (Youn et al., 2005).

III-4 Rôle du réticulum endoplasmique (RE) dans les mécanismes moléculaires de résistance au cadmium

Le réticulum endoplasmique (RE) comporte la majorité des protéines sécrétées et membranaires néo-synthétisées et permet leur repliement et assemblage correct. Il assure également un rôle dans le métabolisme calcique car c'est le lieu privilégié de stockage de ce métal. Le réticulum endoplasmique joue donc un rôle essentiel dans le fonctionnement correct de la cellule. D'autre part, le cadmium, comme il a été précédemment décrit, possède de nombreuses cibles moléculaires portant atteinte à la survie cellulaire. Comment alors le RE peut-il faire face à une telle agression ?

III-4 a Présentation du réticulum endoplasmique (RE)

Le RE est extrêmement sensible à diverses altérations cellulaires comme la perturbation de l'homéostasie calcique (Treiman, 2002) ou tous les stress cellulaires conduisant à une accumulation de protéines mal repliées. Lors de tels événements, la cellule met en place un programme coordonné appelé réponse UPR (*Unfolded Protein Response*) (Rutkowski and Kaufman, 2004).

Le RE joue un rôle très important dans la cellule car c'est l'endroit où les protéines membranaires et sécrétées néo-synthétisées sont repliées et modifiées avant d'être exportées de la lumière du RE vers le Golgi où elles suivent la voie conduisant à leur localisation définitive. Un système de contrôle de qualité efficace garantit que seules les protéines correctement repliées poursuivent toutes les étapes de leur maturation, jusqu'à leur adressage définitif. Deux types de contrôle-qualité des protéines néo-synthétisées sont effectuées dans le RE suivant que les protéines sont glycosylées ou non.

La *N*-glycosylation est un mécanisme post-traductionnel ubiquitaire dans les cellules de mammifères. Elle correspond à l'ajout d'oligosaccharides sur une asparagine (Asn-X-Ser/Thr) des protéines membranaires et sécrétoires. Après diverses transformations conduisant à une monoglucosylation, la protéine est reconnue par une lectine chaperonne, la calnexine ou la calréticuline qui favorise son repliement (Kleizen and Braakman, 2004). Lorsque la protéine a atteint un certain degré de repliement, le glucose restant est éliminé par la glucosidase II. La protéine se sépare ainsi de la lectine chaperonne (Hebert et al., 1995).

Le contrôle des protéines non-glycosylées s'effectue différemment ; ces protéines sont soumises à un autre contrôle de qualité dont on ne sait que peu de choses. Ce sont les chaperonnes les plus abondantes du RE, telles que Bip et Grp94, qui sont supposées intervenir. Bip, ou Grp 78, est une chaperonne cytoplasmique associée au RE et régule le transport des protéines ainsi que leur maturation. Bip fait partie de la famille des Hsp70, elle est donc capable de lier l'ATP et l'ADP. L'hydrolyse de l'ATP provoque une forte liaison de Bip à son substrat et l'échange de l'ATP en ADP induit un changement conformationnel de Bip qui libère le substrat (van Anken and Braakman, 2005).

III-4 b La réponse UPR

Lorsque les cellules eucaryotes subissent un stress intense, les protéines non ou mal repliées ont tendance à s'accumuler et provoquent la réponse UPR pouvant se décomposer en trois phénomènes : l'induction de la transcription de gènes codant pour des protéines de repliement, le ralentissement de la traduction de nouvelles protéines et une augmentation de la dégradation des protéines mal repliées (Mori, 2000). Si le stress est vraiment trop important, la cellule déclenche alors l'activation de signaux additionnels induisant la mort cellulaire (Treiman, 2002). Il existe des moyens pharmacologiques provoquant expérimentalement la réponse UPR, par inhibition de la *N*-glycosylation avec la tunicamycine, ou par diminution brutale des stocks calciques du réticulum endoplasmique (Rao et al., 2004; Treiman, 2002) avec la thapsigargine (Treiman et al., 1998), par exemple.

La protéine **Bip ou Grp 78** est un acteur crucial; elle n'intervient pas que dans le contrôle des protéines non glycosylées ; c'est une chaperonne qui régule la réponse UPR en activant trois protéines : **Ire1, PERK et ATF6** en réponse au stress (Rutkowski and Kaufman, 2004). En conditions normales, BiP se lie à ces trois protéines afin de les maintenir dans le RE. Sous stress, elle se libère, ce qui active les trois protéines en leur permettant de jouer un rôle aussi bien dans l'induction de la transcription que dans le ralentissement de la néo-synthèse de protéines (Bertolotti et al., 2000).

a. Induction de la transcription

Au moment du stress, la transcription de gènes codant pour des chaperonnes et des enzymes favorisant le repliement des protéines est induite, augmentant ainsi la capacité d'aide au repliement dans le RE. Les acteurs clefs de cette étape sont des protéines transmembranaires, **Ire1 α** (*Inositol requiring enzyme 1*) et **Ire1 β** (celle-ci exprimée seulement dans l'intestin), les détecteurs des protéines mal repliées (Mori, 2000). Ces protéines sont composées de domaines N-terminaux situés dans la lumière du RE tandis que les domaines serine/ thréonine kinase et endoribonucléase sont du côté cytoplasmique. Lorsque des protéines incorrectement repliées sont présentes dans le réticulum endoplasmique, elles sont reconnues et le chaperon BiP se dissocie des protéines Ire1. Les protéines Ire1 libérées peuvent s'oligomériser, ce qui stimule leur activité kinase et conduit à leur autophosphorylation. **Ceci stimule leur activité endoribonucléase qui clive alors l'ARNm de la X-box binding protein XBP-1 non épissé** (Iwawaki et al., 2004). Le nouvel ARNm XBP-1 épissé est traduit en un facteur de transcription pXBP-1 capable d'activer la transcription des gènes cibles de l'UPR par liaison à des éléments de réponse au stress du RE.

Un participant complémentaire aux Ire1 a été identifié plus récemment: la protéine **ATF6** (Mori, 2000). En cas d'accumulation de protéines mal repliées, **Grp78 est dissociée d'ATF6 ce qui permet le transport de celle-ci vers le Golgi** (Rutkowski and Kaufman, 2004). Deux protéases SP1 et SP2 libèrent alors la partie N-terminale contenant un motif bZip situé du côté cytoplasmique qui migre au noyau et induit ainsi **l'activation des gènes de transcription de chaperonnes du RE** (Mori, 2000).

b. Diminution de la traduction

Lors du stress, la prise en charge de protéines néo-synthétisées n'est plus aussi efficace et la cellule ralentit donc la synthèse de protéines. Ceci est possible grâce à **PERK** (*Protein kinase-like ER kinase*), protéine kinase transmembranaire située dans le RE (Rutkowski and Kaufman, 2004). La similitude du domaine situé dans le RE avec celui des IRE suggère un système détecteur voisin leur permettant d'agir concomitamment suite à un stress du RE. En conditions normales, la liaison de la protéine chaperonne Grp78 au domaine de PERK se situant dans la lumière du RE le maintient inactif. Sous stress, le complexe PERK/Grp78 se sépare et PERK subit une dimérisation qui aboutit à la phosphorylation mutuelle des kinases

clefs du dimère (Bertolotti et al., 2000). **Les kinases de PERK ainsi activées phosphorylent le facteur d'initiation de la traduction eIF2- α (Eukaryotic translation initiation factor 2), ce qui empêche l'association des ARNm avec les sous unités ribosomales 60S et 40S et qui conduit à l'inhibition de la traduction** (Rutkowski and Kaufman, 2004). En absence de PERK, la cellule est incapable de déclencher la réponse UPR et devient donc très sensible au stress du RE.

Très récemment ont été mis en évidence des effets régulateurs antagonistes du cadmium sur la réponse UPR. Des expériences menées sur des tubules de rat ont montré que le cadmium induisait **la phosphorylation de PERK et donc de eIF2- α ce qui conduit à une protection contre l'apoptose** (Yokouchi et al., 2007); cependant, **le cadmium active également ATF6 ainsi que IRE1 ce qui provoque l'effet opposé à savoir l'induction de l'apoptose** (Yokouchi et al., 2007). Cet exemple illustre parfaitement la capacité du cadmium à induire des phénomènes de phosphorylation par des mécanismes encore mal connus ainsi que le rôle dual du métal.

c. Dégradation

Les protéines mal repliées sont déplacées du RE vers le cytoplasme où elles sont ubiquitinylées puis dégradées par le protéasome. **Ce processus de dégradation est appelé ERAD (ER associated protein degradation) et requiert préalablement que la réponse UPR soit fonctionnelle, ceci pour éviter la saturation totale du RE** (Meusser et al., 2005). La liaison entre le carboxylate C-terminal de l'ubiquitine (G76) et le groupe ϵ -amino d'un résidu lysine du substrat sert de signal à de nombreux processus biologiques, comme les interactions protéine-protéine, l'adressage ou la protéolyse (Pines and Lindon, 2005). La dégradation de la protéine cible en peptides est possible grâce à une série d'enzymes spécifiques qui permettent l'activation de l'ubiquitine (E1) qui forme un thioester avec l'acide carboxylique de G76, activant ainsi sa partie N-terminale pour une attaque nucléophile. Le substrat est ensuite transféré à une deuxième enzyme conjuguant l'ubiquitine (E2) où l'ubiquitine activée est fixée sur le substrat grâce à une ligase (E3). La chaîne poly-ubiquitine qui marque la protéine cible à dégrader se lie spécifiquement au protéasome 26S. Celui-ci dégrade ensuite la protéine, recyclant l'ubiquitine. Le protéasome 26S est constitué d'une fraction de coeur (CP) et de deux parties régulatrices (RP). Le CP ou *Core Particule* 20S est

le cœur catalytique siège de la protéolyse et le *RP* ou *Regulatory Particule* 19S possède plusieurs sous unités reconnaissant l'ubiquitine.

La lactacystine, produit par certaines bactéries du genre *Streptomyces*, se lie à certaines sous-unités du protéasome 20S et inhibe l'activité protéolytique du protéasome, (Fenteany and Schreiber, 1998). Ce composé est spécifique de cette voie de dégradation puisqu'il n'inhibe pas les voies de dégradation lysosomale de la cellule.

Les aldéhydes peptidiques comme le MG132 sont également couramment utilisés comme inhibiteurs du protéasome. Ce sont des analogues de substrats et des inhibiteurs réversibles de l'activité de type chymotrypsine du protéasome. Ce composé inhibe également certaines cystéines protéases lysosomales ainsi que les calpaïnes (Lee and Goldberg, 1998).

d. Influence du cadmium sur la voie ubiquitine-protéasome

Le cadmium peut induire des modifications de protéines conduisant à une protéolyse exacerbée comme dans le cas de Sp-1 (Watkin et al., 2003). Les modifications de type oxydatif dues à un stress oxydant déclenché par le cadmium sont également possibles (III-2 c). Cela conduit à la perturbation du statut redox de la cellule. Les protéines sensibles à ce type de stress sont alors dégradées ultérieurement par le système ubiquitine-protéasome. Ainsi, **l'incubation de tubules proximaux de rat avec 5 µM de cadmium (Thevenod and Friedmann, 1999) provoque une augmentation du taux de protéines ubiquitinylées.** De plus, l'incubation de diverses lignées cellulaires humaines en présence de cadmium provoque **l'augmentation de l'ubiquitinylation de eIF4AE**, un facteur d'initiation de la traduction chez les eucaryotes, **conduisant à une forte diminution de la quantité de protéines** (Othumpangat et al., 2005). Cela se produit par une diminution de la stabilité de la protéine. **Enfin, le cadmium déclenche la dégradation accrue de Hif-1α via le protéasome en condition d'hypoxie** (Chun et al., 2000). L'inhibition de Hif-1 (III.2 d) qui en résulte, supprime l'expression des gènes induits par l'hypoxie comme l'érythropoïétine.

Outre les modifications, le cadmium diminue la solubilité de certaines protéines comme celle d'une protéine impliquée dans l'homéostasie du fer : IRP1 (*Iron Regulatory Protein1*) (Martelli, 2004).

III-4 c Les protéines de stress

Comme nous l'avons décrit précédemment, un des mécanismes mis en place au moment de la réponse UPR est l'induction de chaperonnes moléculaires appelées les protéines de choc thermique (*Heat Shock Proteins*, Hsp). Cette réponse cellulaire est placée sous le contrôle de facteurs de transcription spécifiques, les facteurs de choc thermique HSF. C'est un mécanisme conservé au cours de l'évolution depuis les bactéries jusqu'à l'homme. Les Hsp forment une grande famille dont les divers membres sont désignés par rapport à leur masse moléculaire (Hsp25, 40, 70, 90...). Elles favorisent le repliement correct de protéines et contribuent à leur fonctionnalité. Seules les Hsp intervenant dans la réponse vis-à-vis du cadmium sont décrites ci-dessous. Comment ces protéines sont-elles régulées et quel est leur rôle vis-à-vis de la toxicité du cadmium ?

III-4 c1 Induction de l'expression des Hsp

Chez les eucaryotes, les gènes codant pour des protéines de choc thermique sont sous le contrôle des '*Heat Shock transcription Factors*' (HSF). Pour les Hsp de faible poids moléculaire, ces gènes comportent un motif ADN régulateur nommé '*Heat Shock Element*' (HSE), constitué de motifs répétés GAAn (Morimoto, 1998). Chez les vertébrés, il existe quatre facteurs de liaison au motif HSE qui interviennent dans la régulation de l'activité des gènes codant pour les Hsp. HSF-1 et -2 sont ubiquitaires, HSF-3 n'existe que chez les oiseaux et HSF-4 est spécifique du cœur et du cerveau (Morimoto, 1998). La pluralité des HSF assure une spécificité pour un stress donné. En absence de stress, le facteur de transcription HSF-1 est localisé dans le cytoplasme et le noyau, alors que HSF-2 est cytoplasmique uniquement ; cependant suite à un stress, les deux formes sont présentes au noyau (Wu, 1995). Dans les cellules non stressées, HSF-1 est maintenue sous forme monomérique ne liant pas l'ADN, tandis qu'un stress généré par l'accumulation de protéines dénaturées provoque sa phosphorylation qui entraîne la trimérisation du facteur de transcription. HSF-1, sous forme de trimère phosphorylé, migre au noyau et acquiert une activité fixatrice à l'ADN (Morimoto, 1998) (Figure 9).

L'activation des MAP (mitogen activated proteins)-kinases telles que ERK ou p38 par le cadmium conduit à une augmentation de phosphorylation de HSF-1 qui aboutit à l'induction de Hsp70 (Hung et al., 1998). Les mécanismes d'activation des MAPK sont décrits au paragraphe III-5.

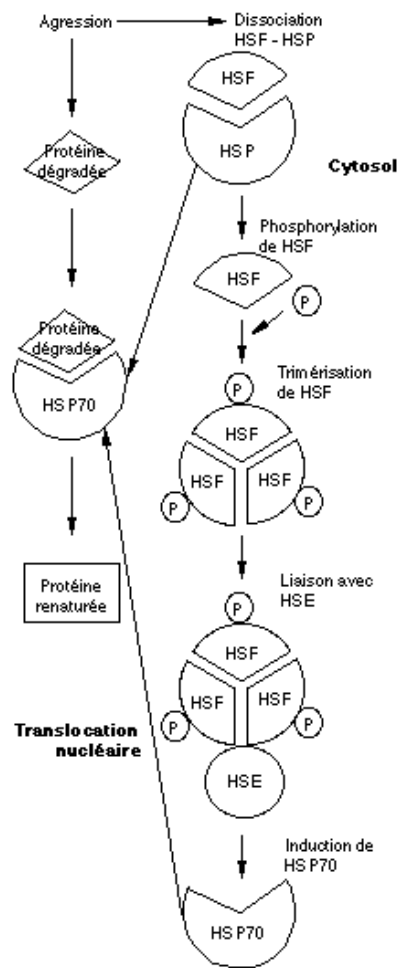


Figure 9 : Mécanisme d'activation des HSP 70 d'après (David, 2001)

III-4 c2 Rôle des Hsp vis-à-vis du stress cadmium

Le rôle protecteur des Hsp vis-à-vis de la toxicité du cadmium est largement décrit dans la littérature. **Diverses Hsp sont surproduites suite à des expositions au cadmium** ; cela varie en fonction de la dose administrée et de la sensibilité des types cellulaires utilisés. La protéine Hsp70 n'est exprimée que dans des cellules traitées à des concentrations de cadmium suffisantes pour inhiber la croissance cellulaire et induire la mort (Urani et al., 2007). En concentration sub-létale, le cadmium induit la transcription des gènes de Hsp 10, 40, 60, 70, et 89 α dans les cellules rénales de singe (COS-7) (Lee et al., 2002).

L'induction des ARNm des Hsp 60 et 70 suite à une exposition au cadmium avait déjà été montrée (Somji et al., 2000) dans les tubules proximaux humains. Dans d'autres lignées cellulaires comme les lignées rénales épithéliales proximales de chien MDCK et distale de porc LLC-PK1, le cadmium induit l'expression du gène de Hsp27 (Bonham et al., 2003).

a. Hsp 70

La famille des Hsp 70 est impliquée dans de nombreuses fonctions cellulaires comme la traduction, la translocation de protéines, la protéolyse, le repliement de protéines, la suppression de l'agrégation et la réactivation de protéines dénaturées. Ses membres sont localisés dans le cytosol, les mitochondries et le RE. La structure des protéines Hsp 70 chez les eucaryotes est très voisine de celle de son équivalent procaryote (appelé DnaK). Hsc 70 représente la protéine constitutive de masse moléculaire voisine de 70 kDa et Hsp 70 est la protéine inductible. Hsp70 est produite à un faible niveau dans les cellules non stressées. Hsp 70 se lie sur les chaînes polypeptidiques naissantes des ribosomes et permet le maintien de la conformation de la protéine néo-synthétisée lors de sa translocation à travers la membrane mitochondriale ou du RE (Liang, 1997). Parmi les Hsp, la protéine BIP ou Grp78 (III-4 b) est associée à ce transport à travers le réticulum endoplasmique.

Le cadmium induit l'expression de Grp78 dans plusieurs types cellulaires comme les fibroblastes de rat NIH3T3 (Sugisawa et al., 2004), les cellules épithéliales pulmonaires humaines A549 (Crouté et al., 2005), ainsi que dans les cellules HeLa (Cigliano et al., 1996).

L'étude de l'effet du cadmium sur des cellules HeLa rendues résistantes au cadmium par exposition à des concentrations croissantes (H454) a apporté de nouveaux éléments pour la compréhension des mécanismes de résistance. Les cellules H454 accumulent des concentrations de cadmium très fortes contrairement aux cellules parentes et supportent des concentrations de cadmium dix fois plus élevées (Cigliano et al., 1996). Par contre la sensibilité vis-à-vis du zinc est identique pour les deux lignées. Les éléments caractéristiques de cette résistance sont :

- Une augmentation d'environ deux fois et demi du taux d'ARNm de métallothionéines par comparaison avec les cellules HeLa dans le cas d'une exposition au zinc ou au cadmium,
- Une surexpression de l'ARNm de Grp78 et Hsp70 par exposition au cadmium mais pas au zinc. La synthèse de Hsp 70 n'est pas modifiée dans les cellules H454 sous choc thermique, signifiant que l'activation de la transcription de Hsp70 est distincte suivant que les

cellules sont exposées au cadmium ou à un choc thermique. De même, les mécanismes de l'activation de la transcription de Grp78 sont distincts suivant une exposition au cadmium ou une forte diminution de calcium.

L'étude de l'évolution de Grp78 vis-à-vis du cadmium a été effectuée sur des cellules épithéliales rénales porcines LLC-PK1, organe cible du cadmium dans l'organisme. Les auteurs ont montré par la technique d'ARN interférentiel dirigé contre Grp78, que le chlorure de cadmium induisait l'accumulation de la Grp 78 dans le RE de manière temporelle et dose dépendante (Liu et al., 2006). De nombreuses études montrent que le cadmium compromet l'intégrité structurale des protéines (Jungmann et al., 1993). Hsp70 joue alors son rôle de chaperonne en se fixant aux protéines endommagées afin de restaurer leur configuration native et donc leur fonction. L'interaction des Hsp70 avec les protéines mal ou non repliés induit une diminution du pool de Hsp70 ce qui déclenche une réponse au stress. L'activation des gènes codant pour les HSP se produit lorsque le *Heat Shock Factor*, normalement associé au pool de Hsp 70, se lie sur le motif *Heat Shock Element* des ARNm déclenchant ainsi la néo-synthèse de Hsp 70 (Morimoto, 1998).

Il a été montré sur des tumeurs de cerveaux de rats que **la présence de cadmium pouvait activer HSF-1 par phosphorylation conduisant à l'induction des gènes de Hsp 70. L'activation de HSF-1 s'effectue via des intermédiaires distincts suivant la dose de cadmium administrée.**

En présence de 60 μ M de cadmium, les protéines ERK1/2 (*Extracellular-regulated protein kinases 1 and 2*) sont phosphorylées conduisant à l'activation de HSF-1 tandis que 100 μ M de cadmium activent préférentiellement la MAP kinase p38 (Hung et al., 1998). De plus une concentration intermédiaire active les deux voies de façon synergique. **L'activation des ERKs par les plus faibles doses de cadmium provoque une réponse mitogène qui est considéré comme un mécanisme d'adaptation en cas d'exposition future au cadmium, tandis que l'activation de p38 est associée à l'induction de l'apoptose.**

Une autre étude réalisée dans les cellules HeLa, a montré que la présence de cadmium et de zinc induisait la fixation de HSF1 sur le motif HSE du gène de Hsp 70. Un nouvel aspect mécanistique de la réponse au stress est suggéré ; en effet le facteur de transcription **MTF-1** impliqué dans l'induction de gènes, entre autres de la métallothionéine, **diminue la transcription de Hsp 70. La répression des gènes régulés par la fixation de HSF1 sur le motif HSE du gène de Hsp 70 s'effectue via une interaction protéine-protéine entre HSF1 et MTF-1** (Uenishi et al., 2006). Par contre HSF1 n'interagit pas avec le complexe

MTF-1/MRE ; ce qui est cohérent avec ce qui avait été rapporté antérieurement, à savoir que HSF1 n'active pas la transcription dépendant de MTF-1 (Saydam et al., 2003).

c. Hsp 40

Il existe actuellement cinq protéines membres de la famille des Hsp40 dans le RE dont ERdj3, assez récemment caractérisée (Nakanishi et al., 2004). Les Hsp40 sont des co-chaperonnes de Hsp70 et ont été proposées comme un stimulant de l'activité ATPase de Hsp70 facilitant la liaison du substrat à la chaperonne. Les Hsp70 sont souvent localisées dans le même compartiment sub-cellulaire et avec plusieurs membres des Hsp40 qui ont des fonctions individuelles spécialisées. ERdj3 est localisée dans la lumière du RE et intervient dans la protection des cellules neuroblastiques en cas de stress du RE provoqué par la tunicamycine ou la thapsigargine (perturbation de l'homéostasie calcique) (Nakanishi et al., 2004).

d. Hsp de faibles masses moléculaires

Localisée dans le cytosol, Hsp 27 migre au noyau en cas de stress. Cette chaperonne possède une activité indépendante de l'ATP. Les Hsp de faibles masses moléculaires (<30kDa) jouent un rôle important, non seulement dans la réponse au stress, mais participent aussi à la régénération de microfilaments et préviennent de la fragmentation de l'actine en cas de stress (Liang and MacRae, 1997). L'association de Hsp27 aux microtubules et tubuline des cellules HeLa en interphase et mitose a notamment été montré par immunoblot et immunohistochimie (Hino et al., 2000). Lorsque Hsp27 n'est pas phosphorylée, elle forme des oligomères afin de jouer son rôle chaperon, et possède une activité inhibitrice de la polymérisation de l'actine. Cependant, l'incubation de cellules médullo-surrénales (Leal et al., 2007) ou de macrophages alvéolaires (Rogalla et al., 1999) **en présence de cadmium induit la phosphorylation de Hsp27 par la MAP kinase activated kinase 2 (MK2) qui dépend de p38** (III-5 c) (Rogalla et al., 1999). L'induction de la voie de signalisation p38 s'effectue probablement par les espèces réactives de l'oxygène générées par le cadmium (Rogalla et al., 1999). La phosphorylation de Hsp27 entraîne la dissociation des oligomères en dimères (Kato et al., 1994). L'intérêt de Hsp27 dans la protection des cellules vis-à-vis du cadmium réside dans son rôle anti-apoptotique, en particulier par interaction directe avec le cytochrome c. Hsp 27 se lie avec la chaîne poly-ubiquitinylée et au protéasome 26S. La surproduction de Hsp 27 dans plusieurs types cellulaires augmente la dégradation de protéines, dont la protéine

phosphorylée I- κ B α , par le protéasome, ce qui permet l'activation du facteur de transcription NF- κ B (Garrido, 2002) et un effet anti-apoptotique (Parcellier et al., 2003).

III-5 Effets du cadmium sur la signalisation cellulaire

Il existe une littérature très abondante concernant les effets du cadmium sur les voies de signalisation impliquant les MAPKs (*Mitogen-activated protein kinases*). La stimulation par le cadmium à divers niveaux de ces voies de signalisation semble impliquée dans les processus de cancérogénèse.

Les MAPKs comprennent une succession de sérine/thréonine kinases activées par phosphorylation en réponse à des voies de signalisation induites par des agents mitogènes ou des conditions de stress. De façon schématique, les participants de ces voies peuvent être représentés par : **activateur>MAPKKK>MAPKK>MAPK> réponse cellulaire**, où MAP(K)n indique une kinase, souvent de kinases, intermédiaire de la voie. Dans les systèmes mammifères, trois catégories majeures de la famille des MAPK sont principalement distinguées : *Extracellular signal-regulated protein kinase* (ERK), *c-Jun NH2-terminal kinase* (JNK), aussi appelé *stress-activated protein kinase* (SAPK), et p38 (Figure 10). Ces divers systèmes vont être présenté ci-après en se référant à un article de revue (Chen et al., 2001).

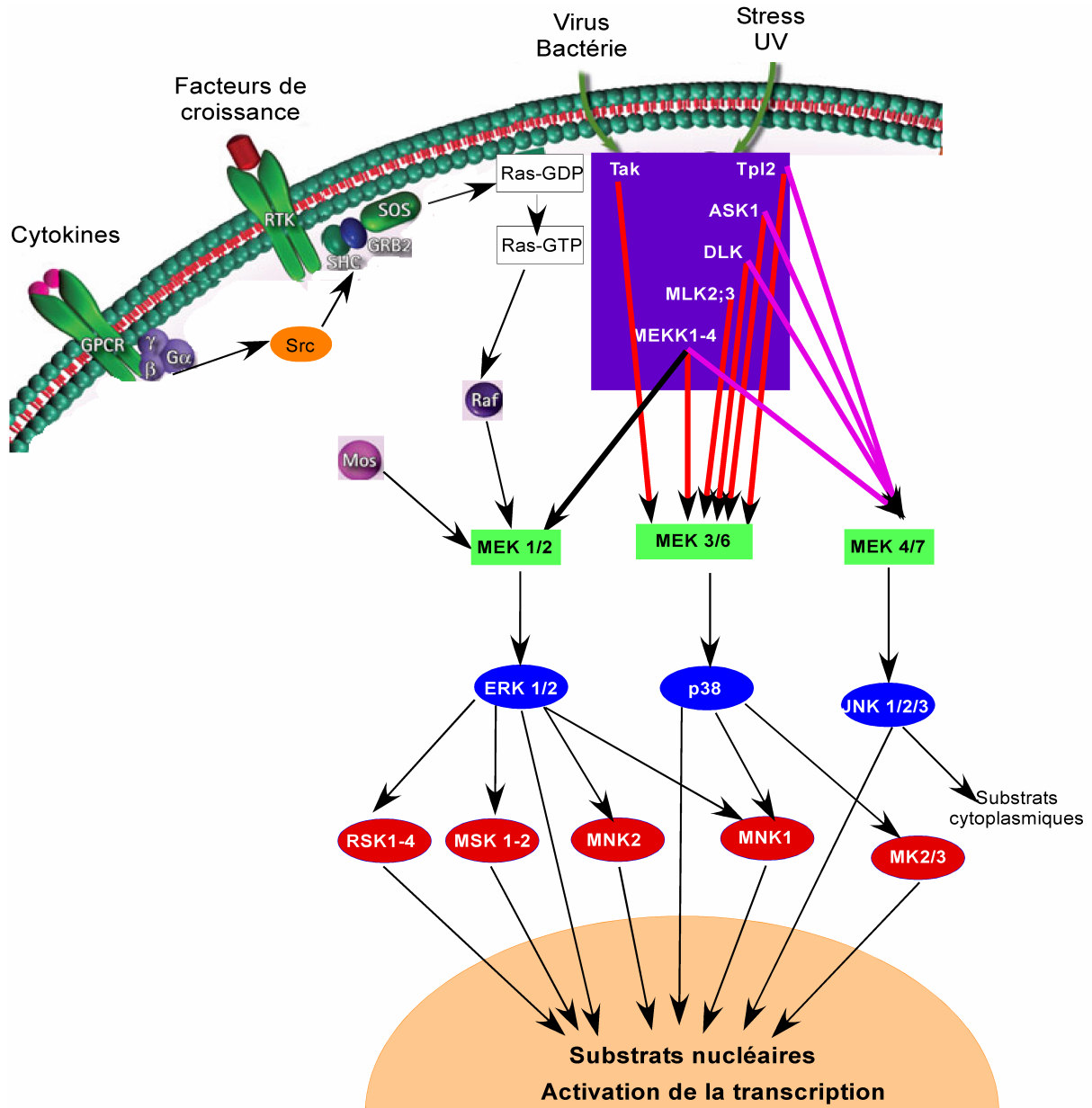


Figure 10: Les voies de signalisation des MAP kinases. Les différents modules MAP kinases chez les mammifères régulent la croissance cellulaire, la différenciation, la réponse au stress et le développement. D'après (Roux and Blenis, 2004).

III-5 a Activation de la voie de signalisation ERK

La voie de signalisation ERK est déclenchée par une grande variété d'hormones, de facteurs de croissance, de différenciation ainsi que par la désorganisation des microtubules.

Une voie bien définie est initiée par la stimulation **des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) à activité tyrosine kinase, RTKs par le ligand approprié**, ce qui provoque une augmentation de l'activité catalytique du récepteur et son autophosphorylation sur les résidus tyrosines. La phosphorylation du récepteur induit la formation de multi-complexes protéiques. Le plus fréquemment, **l'étape suivante est l'activation de la protéine monomérique G, Ras**. La transmission du signal des RTKs vers Ras s'effectue via le recrutement d'adaptateurs moléculaires au récepteur, tels que Shc et Grb2 (*growth-factor-receptor bound protein 2*), via des interactions entre leurs domaines SH (*Src Homology*) 2 et les résidus phosphotyrosines. La seconde interaction est la reconnaissance des motifs riches en proline situées sur les adaptateurs moléculaires par les domaines SH3 du facteur d'échange du nucléotide de la guanine (GEF) et de Sos (*Son of Sevenless*). **Lorsque GEF est engagée dans le complexe, elle induit, chez Ras, l'échange du GDP en GTP, ce qui lui permet d'interagir directement avec plusieurs effecteurs, y compris les isoformes de Raf**. L'augmentation de l'activité kinase de Raf est convertie par la suite via le module MEK-ERK. La phosphorylation par rétroaction de SOS par ERK provoque la dissociation du complexe SOS-Grb2 et l'inactivation de Ras. Dans cette succession, Raf, MEK et ERK jouent les rôles de MAPKKK, MAPKK et MAPK, respectivement.

De toutes les MAPKKKs connues, les isoformes Raf et Mos sont peut-être les seules qui phosphorylent les MAPKKs (MEK) dans une cascade unique. En effet, ces protéines semblent phosphoryler seulement deux membres de la famille MEK, MEK1 et MEK2, et se placent exclusivement dans la cascade ERK/MAPK. La famille des protéines kinases Raf est composée de A-Raf, B-Raf, et Raf-1 (ou c-Raf).

MEK1 et MEK2 font partie de la rare famille de protéines kinases capables de phosphoryler aussi bien les résidus sérines et thréonines que tyrosines. Ces deux isoformes de MEK ont des séquences protéiques similaires, cependant elles semblent être régulées différemment selon l'activateur ascendant (RAF-1, A-RAF, et B-RAF) dans divers types cellulaires et en réponse à divers stimuli extracellulaires. Ainsi il a été rapporté que MEK 1 et 2 contribuaient de manières distinctes à la régulation de l'activité ERK et à la progression G1/S du cycle

cellulaire : le module MEK2-ERK2 inhibe la transition G1/S du cycle cellulaire, alors que le module MEK1-ERK1 inhibe celle en G2/M. Les deux MEKs phosphorylent ERK1/2 sur les résidus tyrosine et thréonine qui se situent dans le segment d'activation du domaine catalytique (appelé encore boucle d'activation). Cette phosphorylation est suffisante pour activer ERK1/2 *in vitro*, comme *in vivo*.

Plusieurs essais biochimiques et expériences de transfection suggèrent qu'ERK1 et ERK2 sont fonctionnellement équivalentes. ERK est une sérine/thréonine kinase qui possède plus de 50 substrats. ERK1 et ERK2 sont des protéines de 43 et 41 kDa qui possèdent 85% d'identité. Ces deux kinases sont ubiquitaires en abondance relative dans certains tissus. Par exemple, ERK2 est la forme prédominante dans les cellules du système immunitaire, alors qu'ERK1 et 2 s'expriment de façon équivalente dans les cellules neuroendocriniennes.

Suite à leur activation et à leur migration nucléaire, elles peuvent phosphoryler plusieurs protéines, principalement des facteurs de transcription tels Elk1, STAT 3, c-Fos, c-Myc (Roux and Blenis, 2004) ainsi que diverses kinases comme RSK (*p90 ribosomal S6 kinase*), MSK (*Mitogen-and stress-activated kinases*) ou MNK (*MAPK-interacting kinases*).

III-5 b Activation de la voie de signalisation JNK/SAPK

Il existe trois formes de JNK/SAPK (*c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase*), toutes ubiquitaires bien que JNK3 soit préférentiellement exprimée dans le cerveau. Les JNK tiennent leur nom du fait qu'elles lient la portion N-terminale de la protéine c-Jun et la phosphoryle sur deux de ses sérines. L'isolement de plusieurs ADNc codant pour ces enzymes et l'analyse subséquente de leur niveau d'expression ont révélé trois gènes avec pas moins de 10 formes épissées différemment. Les domaines catalytiques de JNK1/SAPK γ , JNK2/SAPK α , et JNK3/SAPK β partagent 85% d'identité. Les JNK/SAPKs sont activées par phosphorylation sur deux sites, tyrosine et thréonine séparés par un résidu proline pour donner un motif TPY à l'intérieur de la boucle d'activation. **Les JNK/SAPKs sont activés par les cytokines, certains ligands pour les GPCRs, le stress comme les radiations ultraviolettes, le choc thermique, les agents mutagènes, les ROS et dans une certaine mesure les facteurs de croissance (Roux and Blenis, 2004).**

Les JNKs sont impliquées dans l'apoptose et dans la survie cellulaire selon le contexte (Ip and Davis, 1998), dans la production de cytokines telles IFN α/β et IL-6 et

dans la production de NO. Elles sont aussi responsables de la phosphorylation d'autres protéines formant le facteur de transcription AP-1 telles JunB, JunD, STAT3, ATF2 ainsi que HSF-1.

Deux membres de famille MAPKK, MEK4 et MEK7, ont été impliqués dans les voies JNK/SAPK. Ces deux enzymes phosphorylent les membres de la famille de p38 *in vitro* lorsque qu'ils sont surexprimées, bien que JNK/SAPKs soient les substrats privilégiés. *In vitro*, MEK4 phosphoryle préférentiellement le résidu tyrosine dans le motif TPY de la boucle d'activation de JNK/SAPK, alors que MEK7 phosphoryle préférentiellement le résidu thréonine. En se basant sur cette spécificité, il a été suggéré que ces kinases coopèrent pour activer JNK/SAPKs, tout en conservant l'intégrité du signal. De plus, il a été démontré que MEK4 est principalement activée par un stress environnemental et MEK7 par des cytokines. Ceci semble permettre une plus grande spécificité du signal. Il a aussi été démontré que ces MEK sont présentes dans le cytoplasme et le noyau, contrairement à MEK1 et 2 qui ne sont que dans le cytoplasme, ce qui fait que JNK pourrait être activée aux deux endroits (Tournier et al., 1999). MEK4 et MEK7 sont préalablement activées par plusieurs MAPKKK incluant MEKK 1-4, MLK2-3 (*mixed lineage kinase*) (Tibbles et al., 1996), Tpl-2, TAO1-2 (*thousand and one amino acid kinases*), DLK (*dual leucine zipper kinase*), TAK1 (*transforming growth factor- β (TGF β)-activated kinase*) et ASK1-2 (*apoptosis signal-regulating kinases*). Celles-ci sont activées entre autres, par la famille des petites protéines G Rho et Cdc42 (Bagrodia et al., 1995) lors d'une activation des récepteurs protéines kinases et par le groupe des protéines TRAF lors d'une stimulation par des cytokines (Davis, 2000). ASK est une kinase directement impliquée lors d'un stress oxydant ou en conditions hypoxiques intenses (Zhou et al., 2004). Sa phosphorylation entraîne l'activation non seulement de la voie JNK mais également de p38 conduisant à l'apoptose. Ainsi, la formation d'un complexe Ask1-thioredoxine conduit à la protection de la cellule par inactivation de Ask1 en présence de ROS (Hsieh and Papaconstantinou, 2006).

III-5 c Activation de la voie de signalisation p38

Les MAP kinases p38 α et p38 β sont ubiquitaires. p38 γ (ERK6 ou SAPK3) est principalement exprimé dans le muscle squelettique et il est surexprimé au cours de la différenciation musculaire. p38 δ (SAPK4) est fortement détecté dans les poumons, les reins, les organes endocrines et le petit intestin. Toutes ces kinases possèdent la séquence TGY dans leur boucle d'activation. **La voie p38 est activée par une quantité de stimuli comme la réponse inflammatoire (LPS, TNF α), le stress oxydant, les facteurs de croissance (IL-3), les cytokines, les chocs thermiques ainsi que bien d'autres stress.**

Les protéines MEK3 et MEK6 de la famille des MAPKKs possèdent une spécificité de substrat selon l'isoforme de p38 et n'active que p38 spécifiquement. MEK6 active indifféremment les quatre isoformes tandis que MEK3 active p38 α et p38 β . Ces MAPKK sont activées par une multitude de MAPKKKs telles MLK2/3, TAO, TAK1 (Ono and Han, 2000) qui sont elles même activées par des protéines de la famille des petites protéines G Rho comme Rac et Cdc42 (Bagrodia et al., 1995; Tibbles et al., 1996). Les kinases p38 phosphorylées par les kinases MEK3 et 6 sur leurs résidus thréonine et tyrosine activent ensuite une variété de cibles cytoplasmiques comme PLA2 ou des facteurs de transcription comme STAT1 (Goh et al., 1999), ATF2, p53, NF- κ B, et induit la liaison du site AP-1 en régulant c-jun, c-fos et par la liaison d'ATF2 avec des membres de la famille Jun. P38 active également plusieurs kinases incluant MNK1 (*MAP Kinase Interaction Protein Kinase*) qui est impliquée dans l'initiation de la traduction, MK-2/3 qui vont activer à leur tour CREB (*cAMP response element-binding protein*) et ATF1 (Tan et al., 1996), ainsi que MSK. Tout ceci entraîne la production de plusieurs cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , TNF α , IL-6), et de molécules d'adhésion. p38 est impliquée également dans la prolifération et la différenciation cellulaire, de même que dans l'apoptose (Ono and Han, 2000).

Ainsi décortiquer les relations existant entre ces MAPKKKs et déterminer les MAP kinases qu'elles activent est très complexe et déborde de ce qui est utile dans le cadre de cette thèse.

Le tableau ci-dessous résume les kinases effectrices activées par ERK et p38 ainsi que les principaux effets qui en résultent. D'après (Roux and Blenis, 2004) et (Pearson et al., 2001).

MAPK	MK	Substrat MK réponse biologique
ERK 1-2	RSK1-4	Régulation transcriptionnelle: TIF-1A Prolifération cellulaire : CREB, c-fos, c-jun Survie cellulaire : Bad, I κ B α
ERK / p38	MSK1-2	Réponse nucléaire : histone H3 Régulation transcription : CREB, ATF1, STAT3
	MNK 1-2	Traduction ARNm : eIF-4 ^E
P38	MK 2-3	Traduction/ stabilité ARNm Régulation transcriptionnelle : CREB Réorganisation actine : Hsp 27

III-5 d Fonctions biologiques de la voie de signalisation des MAPK

Cette partie ne se veut en aucun cas exhaustive, la diversité des réponses physiologiques qui résultent de l'activation de ces voies est trop complexe pour être détaillée. Les principaux effets physiologiques impliqués dans la signalisation des voies ERK, JNK et p38 vont être présentés ci-après en se référant à un article de revue (Widmann et al., 1999).

a. Conséquences physiologiques de l'activation de ERK

ERK-1 et -2 possèdent une grande variété de substrats (voir III-5a) aux fonctions cellulaires diverses. Cependant les effets de la phosphorylation des substrats de ERK diffèrent grandement en fonction du type cellulaire et d'autres paramètres. De manière générale, il y a une assez bonne corrélation entre l'activation des ERK -1/-2 et la prolifération cellulaire. Les facteurs de croissance comme EGF (*Epidermal growth factor*) et PDGF (*Platelet-derived growth factor*) qui stimulent la prolifération cellulaire induisent l'activité des ERK de manière persistante. Toutefois dans des muscles lisses, l'activation de ERK-1/-2 conduit à la sécrétion de PGE₂ (*Prostaglandin E2*) qui inhibe la prolifération cellulaire. Ces exemples montrent que l'activation de la voie de signalisation des MAPK ERK-1/-2 se traduit soit par la prolifération,

soit par l'inhibition de la croissance en fonction du répertoire de gènes régulant un type cellulaire donné.

De plus la durée ainsi que l'intensité du signal transmis à travers la voie ERK-1/-2 peut contribuer soit à la prolifération soit à la différenciation en réponse aux stimuli. Ainsi, le traitement des cellules neuroendocrines PC-12 par soit de l'EGF soit du NGF (*Nerve Growth Factor*) active les voies de signalisation ERK de manière opposée puisque le premier agent entraîne la prolifération tandis que le second induit l'arrêt de croissance et stimule la différenciation. Une explication apportée à cette différence réside dans la durée et l'amplitude de la stimulation des MAPK par chacun des deux agents ; l'activation par EGF est transitoire et permet un retour à l'état basal tandis que NGF stimule ERK de façon plus soutenue.

Comme nous l'avons décrit précédemment, la protéine Rsk est un substrat de ERK 1/2 (III-5 a). La conséquence de la phosphorylation de Rsk sur les théonines 79 et 396 est une translocation nucléaire suivie de la phosphorylation de c-Fos. La protéine Rsk phosphoryle également GSK3 (*glycogen synthase kinase 3*) conduisant à l'inhibition de son activité. Cela entraîne l'activation de c-Jun qui est sinon réprimé en conséquence de sa phosphorylation par GSK3. Cette inhibition transitoire de GSK3 a été proposée comme un mécanisme d'activation rapide de c-Jun. L'activation concomitante des facteurs de transcription c-Fos et c-Jun augmente la prolifération cellulaire.

La voie de signalisation ERK-1/-2 est associée à l'organisation des microtubules (*Microtubule-organizing center* ou MTOC) au cours de la phase de mitose du cycle cellulaire, suggérant un rôle de ces kinases dans le contrôle de fonctions MTOC. Il a été montré dans les fibroblastes que ERK-1/-2 modulaient l'expression de la cycline D1 ainsi que les kinases qui en dépendent afin de contrôler la progression de la phase G1 du cycle. L'activation de la voie ERK permet la protection des cellules vis-à-vis de l'apoptose. Dans les cellules de fibroblastes murins, l'inhibition des ERK empêche l'apoptose déclenchée par TNF- α .

b. Conséquences physiologiques de l'activation de JNK

Les substrats de JNK sont exclusivement des facteurs de transcription. La phosphorylation par JNK de c-Jun sur les sérines -63 et -73 augmente la formation de l'homodimère Jun/Jun ainsi que de l'hétérodimère Jun/ATF2. La phosphorylation de c-Jun par JNK permet sa stabilisation en réduisant sa dégradation par le système ubiquitine-protéasome.

Bien qu'il n'ait jamais été montré que l'activation de JNK en réponse aux stress suffit à induire l'apoptose à elle seule, JNK est cependant nécessaire à l'induction de ce processus. Lors de l'apoptose déclenchée par la voie JNK, la transcription dépendante de c-Jun conduit à la synthèse de protéines pro-apoptotiques. En réponse aux dommages à l'ADN, les ligands Fas (FasL) sont exprimés à la surface des cellules T ce qui active Fas et induit l'apoptose. L'expression des ligands Fas requiert l'activation du complexe AP-1 par JNK. Malgré ces observations il a été suggéré que JNK possédait un rôle anti-apoptotique suite à l'activation du facteur de transcription Bcl-2. De plus dans les cellules de glioblastome T98G, la voie JNK semble réguler la réparation de l'ADN. L'activation de la voie JNK contribue aussi aux réponses inflammatoires. Par exemple, JNK est activée au cours de la réponse antigénique au niveau de la co-stimulation des cellules T, et contribue à la sécrétion de l'interleukine IL-2 et à la prolifération des thymocytes.

c. Conséquences physiologiques de l'activation de p38

De même que les deux voies de signalisation présentées auparavant, p38 phosphoryle de nombreux substrats. Nous retiendrons principalement le rôle de p38 vis-à-vis des processus inflammatoires. L'activation de p38 induit la production de cytokines IL-1 et TNF- α dans les monocytes stimulés. De plus, l'inhibition de p38 empêche la prolifération induite par IL-2 et IL-7. P38 est également impliquée dans le processus d'apoptose. Plusieurs stress comme le choc osmotique ou les irradiations UV qui provoquent l'apoptose activent l'activité kinase de p38. Comme pour JNK, la fixation de ligands aux récepteurs de mort comme Fas ou TNF, et leur activation consécutive, mène à la phosphorylation de p38. Cependant, pour certains types cellulaires, p38 est activée sans pour autant qu'il y ait apoptose.

De ce résumé très bref des conséquences biologiques de l'activation des MAP kinases, il apparaît clairement que le devenir cellulaire dépend très étroitement des conditions et du type cellulaire considéré. Les effets du cadmium sur ces processus tels que présentés ci-dessous doivent donc tenir compte de cette variabilité.

III-5 e Rôle du cadmium dans la signalisation

De très nombreux effets du cadmium sur l'activation des MAPK ont été rapportés que ce soit sur p38 et ERK dans les cellules tumorales du cerveau de rat (Hung et al., 1998) ou encore sur JNK dans les cellules épithéliales rénales de porc (Matsuoka and Igisu, 1998).

Même si le cadmium induit la phosphorylation de plusieurs MAP kinases, une voie est souvent privilégiée par rapport aux autres suivant le type cellulaire et la dose d'exposition. Ainsi, les pro-monocytes incubés en présence de diverses concentrations de cadmium sont sujets à l'apoptose déclenchée via la phosphorylation rapide de p38 bien que celle-ci soit accompagnée de la phosphorylation plus lente de ERK1/2 (Galan et al., 2000). De même une étude menée sur les cellules épithéliales pulmonaires de rat indique que bien que les trois protéines kinases, ERK, p38 et JNK soient phosphorylées en présence de cadmium, seule la phosphorylation de p38 est requise pour induire l'apoptose (Lag et al., 2005). P38 participe également à la toxicité du cadmium de manière indirecte. En effet, comme il a été décrit précédemment au paragraphe III-4-c2 d, le cadmium engendre la dissociation de l'oligomère Hsp27. Dans les cellules mésangiales de souris, l'augmentation de la phosphorylation de Hsp25, protéine orthologue à Hsp27 chez l'Homme, est réalisée par p38, activée par le cadmium. La phosphorylation de Hsp25 et la dissociation de l'oligomère en dimère sont suivies de l'association de Hsp25 avec les microfilaments, ce qui provoque une induction de la contraction du glomérule et la perméabilité consécutive au cadmium. **Ainsi, Hsp25 peut participer à la néphrotoxicité du cadmium via l'induction des MAPK** (Hirano et al., 2005).

Une autre étude réalisée sur diverses lignées cellulaires, telles que HEK, HepG2 ou HeLa, ainsi que sur des ostéoblastes de rat et macrophages de souris a mis en évidence la susceptibilité des cellules à de faibles concentrations de cadmium, ainsi que la phosphorylation soutenue d'ERK conduisant à la mort cellulaire (Martin et al., 2006b). De même, une faible concentration (1 μ M) d'exposition au cadmium d'une lignée cellulaire lymphoblastique engendre la phosphorylation d'ERK et de p38 tandis que JNK est phosphorylée en présence de 20 μ M (Iryo et al., 2000). Cependant, la phosphorylation d'ERK est impliquée dans un processus d'apoptose indépendant du calcium, ce qui ne semble pas être le cas pour les deux autres candidats.

Enfin la troisième voie de signalisation, JNK, est impliquée par exemple dans l'apoptose neuronale déclenchée par l'activation consécutive de Ask1 puis de MKK4 suite à l'exposition au cadmium (Kim et al., 2005) ou encore dans l'apoptose de macrophages de souris suite à une augmentation du calcium intracellulaire et d'espèces réactives de l'oxygène (Kim and Sharma, 2004). L'activation par le cadmium des trois voies de signalisation précédemment décrites au sein d'une même étude est très inégale comme par exemple dans les cellules issues d'un carcinome pulmonaire. Tandis que les voies JNK et p38 sont activées

par le cadmium en coopération afin d'induire l'apoptose des cellules, la diminution de ERK1 et 2 par de faibles concentrations de cadmium contribue également à l'apoptose et l'inhibition de la croissance cellulaire (Chuang et al., 2000).

Les cas précédemment décrits permettent de conclure que l'activation de la phosphorylation de ERK, JNK et p38 conduit à l'apoptose. Cependant, ces voies de signalisation peuvent être impliquées dans des mécanismes de résistance vis-à-vis du cadmium. En effet, des cellules épithéliales pulmonaires de rat rendues résistantes au cadmium suite à leur adaptation à des concentrations croissantes de cadmium, présentent une diminution de la phosphorylation de JNK 1/2 après exposition au cadmium et par rapport aux cellules non résistantes (Lau et al., 2006).

En accord avec l'état des connaissances décrit en III-5d, les effets du cadmium vis-à-vis de la signalisation cellulaire sont très variés et dépendent très fortement du contexte cellulaire.

IV. Objectifs du travail de thèse

Comme nous avons pu l'établir tout au long de l'introduction, le cadmium, toxique environnemental, possède de nombreux effets sur la cellule. Ce métal agit à la fois par mimétisme avec des métaux essentiels pour la cellule comme le calcium ou le zinc, et par fixation sur les nombreux thiols réactifs des cellules. Dès lors que le cadmium intracellulaire endommage divers éléments cellulaires et perturbe plusieurs voies de signalisation, il s'avère complexe de décrypter les mécanismes de toxicité de ce métal.

La partie expérimentale de ce travail a eu pour but d'examiner si, et comment, l'accoutumance de cellules épithéliales humaines à de fortes concentrations de zinc leur permettait de résister à de fortes expositions au cadmium. Il a en effet été décrit que la présence de zinc réduisait la toxicité du cadmium dans diverses situations; cependant les mécanismes de protection ne sont, à ce jour, pas totalement élucidés. Dans une première partie, l'étude comparative de l'effet du cadmium sur des cellules résistantes au zinc et sur des cellules parentes a été réalisée. Les similitudes et les différences de la prise en charge du zinc et du cadmium, deux métaux qui possèdent des propriétés physico-chimiques similaires, par les deux lignées cellulaires ainsi que les conséquences vis-à-vis des phénomènes oxydants ont été étudiées. Dans un deuxième temps nous nous sommes intéressés à quelques hypothèses mécanistiques pouvant expliquer la production d'espèces réactives de l'oxygène par le cadmium. Une possibilité est l'inhibition ou la diminution des thiols comme le glutathion par le cadmium ainsi que l'interférence de ce toxique avec un métal de transition essentiel pour la cellule et possédant des propriétés redox comme le fer. Ainsi, les effets du cadmium sur le système de régulation de l'homéostasie du fer chez les animaux assuré par les acteurs IRP (*Iron Regulatory Proteins*) / IRE (*Iron Responsive Element*) ont été étudiés dans certains organes de souris intoxiquées et dans les lignées cellulaires utilisées ci-dessus.

Enfin, les différences existant entre la lignée résistante au zinc et la lignée parente ont été examinées à une échelle plus globale telle qu'accessible par l'électrophorèse bi-dimensionnelle ou l'étude comparative des ARN messagers. La troisième partie du mémoire est donc constituée de l'étude protéomique réalisée sur ces deux lignées afin d'examiner quelles protéines contribuaient au phénotype de la lignée résistante au zinc. La quatrième et dernière partie de ce travail a été conçue dans le but de déterminer les influences de chacun des deux métaux zinc et cadmium sur la réponse transcriptionnelle de ces cellules.

Le but général du travail présenté a été d'essayer de progresser dans la compréhension des mécanismes par lesquels le cadmium induit des effets délétères et de ceux qui peuvent réserver les cellules animales de cette toxicité.

Chapitre 1 : Etude des mécanismes de
résistance vis-à-vis du cadmium chez une
lignée cellulaire dérivée de la lignée
épithéliale HeLa.

Chapitre 1 : Etude des mécanismes de résistance vis-à-vis du cadmium d'une lignée cellulaire dérivée de la lignée épithéliale HeLa.

I-1. Etudes antérieures des mécanismes de résistance vis-à-vis du cadmium.

La complexité et la diversité des dommages biologiques provoqués par le cadmium rendent l'étude des mécanismes de toxicité du métal particulièrement difficile. C'est dans le but de faciliter ce type d'étude, ainsi que la compréhension des mécanismes, que des lignées de cellules mammifères ont été rendues résistantes au cadmium. Ainsi l'étude comparative entre la lignée résistante et la lignée sensible d'origine devrait mettre en évidence des différences pertinentes. Parmi les huit articles présentés dans le tableau ci-dessous, six ont été publiés pendant ma thèse.

(Beattie et al., 2005)		
Type cellulaire	Adaptation	DL ₅₀ après 24 h exposition
CHO	Aucune Sur-expression de la MT-1 souris	DL ₅₀ = 132 µM au lieu de 10 µM
<u>Causes résistance</u> : Sur-expression de la métallothionéine.		
(Cigliano et al., 1996)		
Type cellulaire	Acclimatation	DL ₅₀ après 24 h exposition
HeLa	Sélection des clones résistants aux concentrations croissantes de cadmium de 5 µM à 45 µM. La lignée résistante H454 est maintenue dans 45 µM de Cd et 80 µM de zinc.	DL ₅₀ située entre 200 et 300 µM de cadmium au lieu de 30 à 35 µM après 10 de stress. 24 heures avant d'effectuer le stress cadmium, les cellules sont inoculées dans du milieu de culture sans métal ajouté.

Causes résistance: Dans les cellules H454 résistantes, le cadmium s'accumule plus que dans les cellules parentes HeLa. Le niveau de transcrits des métallothionéines est plus élevé dans les cellules résistantes tout comme celui des protéines chaperons Hsp70 et Grp78. Les mécanismes de résistance impliquent donc la MT ainsi qu'une sur-expression des chaperons permettant une optimisation du repliement des protéines endommagées par le stress.

(Croue et al., 2005; Hatcher et al., 1995)

Type cellulaire	Acclimatation	DL ₅₀ après 24 h exposition
Pneumocytes Humains Lignée A549	Acclimatation à 10 µM de cadmium.	DL ₅₀ = 36.8 µM au lieu de 6.9 µM pour les cellules pulmonaires sensibles.

Causes résistance : Le niveau de métallothionéines ne diffère pas entre les deux types cellulaires. La résistance vis-à-vis du cadmium implique une protection du réticulum endoplasmique, car les cellules résistantes minimisent la proportion de protéines mal repliées et ne sur-expriment aucune protéine parmi HSP90A, HSP27, HSP40 et GRP78, contrairement aux cellules parentes sensibles en présence de cadmium. La résistance des cellules implique également la sur-expression de glutathion peroxydase.

(Himeno et al., 2002; Yanagiya et al., 2000)

Type cellulaire	Acclimatation	DL ₅₀
Fibroblastes d'embryons murins	Cellules sans métallothionéines I et II. Les cellules ont été acclimatées à 10 µM de cadmium dans leur milieu de culture.	non mesuré

Causes résistance : diminution de l'accumulation de cadmium par rapport aux cellules sensibles suite à un stress cadmium. L'entrée de cadmium est réduite de 10%.

Les voies d'entrée impliquées sont sensibles au manganèse.

(Leslie et al., 2006)		
Type cellulaire	Acclimatation	DL ₅₀ après 24 heures
Fibroblastes d'embryons murins	Cellules sans métallothionéines. Les cellules ont été acclimatées à 10 µM de cadmium dans leur milieu de culture.	DL ₅₀ = 20 µM pour les cellules résistantes et 0.3 µM pour les cellules sensibles.
<u>Causes résistance</u> : répression dans les cellules résistantes de la sous unité alpha 1G d'un canal voltage-dépendant de type T. Cette répression induit une diminution de l'influx de cadmium dans la cellule.		
(Jeon et al., 2004)		
Type cellulaire	Acclimatation	DL ₅₀ après 24 heures
Monocytes humains U937	Augmentation progressive de la concentration de cadmium dans le milieu de culture de 5 à 50 µM et sélection d'un clone résistant.	DL ₅₀ = 20 µM pour les cellules sensibles et > 50 µM pour les cellules résistantes.
<u>Causes résistance</u> : une étude protéomique a mis en évidence une sur-expression de la calbindine D28 chez les cellules résistantes suivit d'une augmentation du piégeage du calcium par cette protéine. Cela a pour conséquence une diminution de l'activation des voies apoptotiques.		
(Lau et al., 2006)		
Type cellulaire	Acclimatation	DL ₅₀ après 48 heures
Cellules épithéliales pulmonaires de rat	Augmentation progressive de cadmium de 1 à 20 µM dans le milieu de culture au bout de 20 passages.	DL ₅₀ = 20 µM pour les cellules sensibles et 60 µM pour les cellules résistantes.
<u>Causes résistance</u> : diminution de la phosphorylation de JNK 1/2 dans les cellules résistantes, ce qui confère une tolérance accrue vis-à-vis de la mort cellulaire.		

Les travaux antérieurs effectués sur l'étude des causes de la résistance au cadmium ont utilisé soit une acclimatation progressive des cellules vis-à-vis du cadmium, soit une adaptation des cellules par sur-expression de métallothionéines. Ainsi, les mécanismes de résistance mis en évidence sont très variés, ils montrent notamment le rôle des métallothionéines qui permet la

protection accrue des cellules vis-à-vis de la toxicité du cadmium dans une certaine gamme de concentrations. Cette résistance implique également une protection accrue du réticulum endoplasmique ainsi qu'une tolérance vis-à-vis des processus apoptotiques. Toutes ces indications permettent de mieux appréhender les cibles du cadmium et le rôle relatif des divers acteurs impliqués dans la protection vis-à-vis du cadmium.

L'originalité du modèle utilisé ici pour étudier les mécanismes de résistance vis-à-vis du cadmium, réside dans l'utilisation d'une lignée cellulaire déjà résistante à un autre métal qui de plus possède des propriétés physico-chimiques similaires, le zinc. Ces cellules résistantes au zinc sont issues de la lignée épithéliale HeLa et ont été nommées HZR (*High Zinc Resistant HeLa cells*).

I-2. Présentation du modèle cellulaire utilisé.

Les cellules HZR ont été mises au point par le Dr. Chimienti dans le but d'étudier les mécanismes de résistance vis-à-vis du zinc. Les cellules HZR sont, à l'origine, des cellules épithéliales HeLa acclimatées à des concentrations de zinc croissantes et dont un clone résistant a été sélectionné (Chimienti et al., 2001). Ces cellules sont constamment maintenues dans 200 μM de zinc, concentration létale pour de nombreux types cellulaires, y compris les cellules HeLa.

Un bref résumé de la caractérisation des cellules HZR effectuée par le Dr. Chimienti sera utile pour mieux situer les résultats obtenus quant à la résistance de ces cellules en présence de cadmium.

- Les études de cytotoxicité effectuées sur vingt-quatre heures ont déterminé la concentration de zinc à partir de laquelle il ne restait plus que 50% de cellules viables (CL_{50}). Cette concentration est de 150 μM pour les cellules HeLa et de 320 μM pour les cellules HZR. De manière intéressante, les cellules HZR non maintenues dans 200 μM de zinc pendant trois ou sept jours possèdent une CL_{50} d'environ 230 μM et cette valeur atteint celle des cellules HeLa (150 μM) après 21 jours sans ajout de zinc. Donc la résistance des cellules HZR diminue lorsqu'elle n'est pas entretenue.

- Les cellules HZR possèdent également un contenu en zinc intracellulaire bien plus élevé que celui des cellules HeLa. Les cellules HZR non entretenues dans un milieu en

présence de zinc possèdent un contenu intermédiaire, plus riche dans le cas de cellules dont le milieu n'a pas été supplémenté en zinc pendant trois jours que pendant sept jours.

- Les cellules HZR semblent également plus sensibles que les cellules HeLa en cas de stress oxydant généré par l'ajout de peroxyde d'hydrogène.
- Enfin les métallothionéines contribuent à la résistance des cellules HZR vis-à-vis du zinc comme attendu: leur surexpression a été mise en évidence par rapport aux cellules HeLa.

I-3. Présentation des axes de travail

Le zinc est un métal de transition de la même colonne du tableau périodique que le cadmium. Par conséquent, ces deux métaux possèdent des propriétés physico-chimiques similaires. Par ailleurs, le zinc est indispensable à la cellule dans laquelle il joue de nombreux rôles dans la structure et la fonction de protéines et enzymes (Cousins et al., 2006b). Le zinc a aussi un rôle de molécule signal dans certaines situations particulières comme dans les neurones. En effet, dans certains neurones comme les neurones glutamatergiques, le zinc est relâché des neurones pré-synaptiques pour être recapté par les neurones post-synaptiques, il permet ainsi de moduler l'excitabilité neuronale (Frederickson et al., 2000). Ce métal possède également des propriétés anti-oxydantes et il est d'ailleurs décrit que sa présence réduit la toxicité du cadmium dans diverses situations (Szuster-Ciesielska et al., 2000). Cependant les mécanismes du rôle protecteur du zinc restent encore à déterminer plus précisément.

L'objet de ce travail a été d'examiner en quoi des cellules épithéliales humaines maintenues dans de fortes concentrations de zinc leur permettaient de résister à de fortes expositions au cadmium. Cette étude a été effectuée par comparaison entre des cellules résistantes au zinc, appelée *HZR* et des cellules parentes HeLa.

Dans un premier temps, les études de cytotoxicité vis-à-vis du cadmium et réalisées sur vingt-quatre heures ont permis de mettre en évidence la résistance remarquable des cellules HZR en comparaison des cellules parentes HeLa. Afin de caractériser plus en détail les mécanismes potentiellement impliqués dans la résistance, la production intracellulaire d'espèces réactives de l'oxygène et les conséquences sur l'ADN ont été mesurées. Certaines protéines pouvant intervenir dans le trafic de cadmium, ainsi que le taux de glutathion qui joue un rôle très important en situation de stress oxydant et dont l'affinité vis-à-vis du cadmium est grande, ont également été étudiés. La localisation intracellulaire du cadmium par microscopie confocale a été déterminée. Enfin, les mesures de cadmium intracellulaire ont permis d'apporter une explication quant à la résistance des cellules HZR lors d'expositions massives. Cette

information d'importance nous a incitée à explorer les principales voies d'influx et d'efflux du cadmium connues à ce jour.

Les résultats de ces études indiquent que la voie d'entrée de cadmium éteinte chez les cellules HZR est inédite puisqu'elle ne correspond pas à des systèmes moléculaires de transport de cadmium préalablement caractérisés.

I-4. ARTICLE 1: Resistance to high zinc concentrations of a human epithelial cell line imparts them with insensitivity to large cadmium challenges.

RESISTANCE TO HIGH ZINC CONCENTRATIONS OF A HUMAN EPITHELIAL CELL LINE IMPARTS THEM WITH INSENSITIVITY TO LARGE CADMIUM CHALLENGES

Estelle Rousselet¹, Pierre Richaud², Thierry Douki³, Jocelyne Garcia Chantegrel³, Alain Favier³, Alexandre Bouron¹ and Jean-Marc Moulis¹

Affiliations:

¹ Institut de Recherches en Sciences et Technologies du Vivant, CEA; CNRS; Université Joseph Fourier, Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux (UMR 5249), 17 rue des Martyrs, F-38054 Grenoble, France

² DSV/IBEB/SBVME/LB3M, UMR 6191 CNRS/CEA/Université Aix-Marseille, Saint-Paul-lez-Durance, F-13108 France

³ Laboratoire "Lésions des Acides Nucléiques"; Service de Chimie Inorganique et Biologique UMR-E 3 CEA-UJF, CEA/DSM/Département de Recherche Fondamentale sur la Matière Condensée; CEA-Grenoble; 38054 Grenoble Cedex 9; France

Abbreviations:

HZR: High Zinc Resistant HeLa cells; PBS: phosphate buffered saline; BTC-5N: 5-nitrobenzothiazole coumarin; 8-oxo-dG: 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine; EDTA: ethylene diamine tetraacetate; BSO: D, L-buthionine S, R-sulfoximine; DCF(H); (dihydro)dichlorofluorescein; LC₅₀: lethal concentration for 50% of the cells.

Correspondence:

* Jean-Marc Moulis, CEA-Grenoble,IRSTV/LCBM, 17 rue des martyrs, F-38054 Grenoble Cedex 9, France. Tel: (33) 4 38 78 56 23, e-mail: jean-marc.moulis@cea.fr

ABSTRACT

A previously developed human epithelial cell line (HZR) able to grow in the presence of high zinc concentrations has been analyzed for its ability to sustain high cadmium concentrations. Exposure to large amounts of cadmium acetate for 24 hours did not significantly impacted viability since the concentration at which 50% of the cells remained viable was determined at 250 μ M. For comparison, half of parental HeLa cells were killed by exposure to 7 μ M cadmium. Despite being challenged by 35 fold higher cadmium concentrations than HeLa cells, HZR cells did not display increased DNA damage, increased protein oxidation, or changed intracellular cadmium localization. Cellular death by apoptosis, production of reactive oxygen species, and the need for glutathione were increased in HZR cells as compared to HeLa cells. However, the major cause of resistance against cadmium by HZR cells was by avoiding cadmium entry into cells. This was demonstrated by measuring the intracellular content of the metal for different cadmium doses and by cellular imaging of cadmium uptake. The analysis of formerly identified cadmium transporters in different animal cells did not evidence their involvement in the resistance of HZR cells against cadmium. This result highlights a strategy of limited cadmium access implemented by cells via inactivation of a new transport system for cadmium.

INTRODUCTION

Among toxic heavy metals, cadmium has gained a prominent place since it naturally occurs in the environment with other metal ores and it has been used in many industrial applications (Satarug et al., 2003). Therefore, humans may be exposed to chronic or accidentally acute concentrations of this metal and deleterious biological effects may follow: indeed cadmium accumulates in tissues over time with lung, kidney, and liver being prominent targets. Lung carcinogenesis, renal dysfunction, and osteoporosis are major consequences of cadmium exposure.

As an element without any biological function in mammalian cells, cadmium enters cells by molecular mimicry with several essential metals (Bridges and Zalups, 2005). The toxicological mechanisms exerted by cadmium are mainly due to its ease of binding to a range of bio-molecules (Beyersmann and Hechtenberg, 1997) and to further interference with other metal homeostasis (Martelli et al., 2006), mainly calcium, zinc, iron, and manganese. Among the latter, zinc is the most closely related essential metal to cadmium since it also belongs to the same column of the periodic table and shares many physico-chemical properties with it. Indeed, zinc homeostasis has often been alluded to as a target of cadmium toxicity. The main zinc-binding and zinc-responsive proteins in mammalian and other cells, metallothioneins, also efficiently bind cadmium. Consequently, zinc has been proposed to protect cells from cadmium insult, by triggering upregulation of the main cellular elements able to trap cadmium. However the details of this possible protective mechanism are not fully understood due to its complexity, including for the cadmium effect on metallothioneins (Saydam et al., 2002; Zhang et al., 2003).

Since understanding mechanisms of cadmium resistance should shed light on the pathways leading to toxicity, the sensitivity to cadmium of a human epithelial cell line derived from HeLa cells by increased resistance to zinc, called HZR (Chimienti et al., 2001), has been investigated herein. This cell line has been shown to upregulate metallothioneins and to accumulate a large amount of zinc in intracytoplasmic vesicles. Consequently these cells can sustain ca. 2.5 fold higher zinc concentration than the parental HeLa cell line while preserving the same viability. This occurs at the expense of increased sensitivity to oxidative stress, probably because metallothioneins are already involved in controlling the large intracellular zinc concentration and they are less available to participate to resistance against oxidative stress (Chimienti et al., 2001). We report herein that zinc-resistant cells are indeed resistant to high cadmium concentrations but the underlying mechanism is different from that active with

zinc. Therefore, previously identified pathways of cadmium transport and several targets of cadmium damage have been analyzed in this particular cell line by comparison with HeLa cells. All these features were found to be very similar in both zinc-resistant and reference cells, but impeded uptake of cadmium was demonstrated in the former. This model system thus provides an unprecedented tool to study regulation of cadmium uptake.

MATERIALS and METHODS

Cell Culture

Epithelial human cervix carcinoma HeLa cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) with 2 mM L-glutamine and 5% heat-inactivated fetal bovine serum at 37°C with a gas mixture of 5% CO₂ and 95% air. High Zinc resistant cells (Chimienti et al., 2001) were routinely grown as HeLa cells in the same medium supplemented with 200 µM zinc acetate.

MTT cell viability assay

The cytotoxicity of cadmium acetate on HeLa and HZR cells was determined by a modified MTT (3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide) method (Carmichael et al., 1987). Three thousand cells in 100 µl of culture medium were plated in 96-well plates and left in the CO₂ incubator for 24 hours before being exposed to cadmium acetate. Viability was measured 24 hours later: ten µl of 5 mg/ml MTT were added in each well and the cells were incubated at 37°C for 3 h. Viable cells convert the soluble yellow MTT to insoluble purple formazan by the action of mitochondrial dehydrogenases. The medium was then removed, and the precipitate was dissolved in 100 µl of dimethyl sulfoxide. The optical density was measured at 570 nm with a microplate reader (Multiskan, Thermo Labsystem RC, Saint-Herblain, France). The percentage of viable cells (%) was calculated as follows: % = $[(A-B)/(C-B)] \times 100$ where A = OD₅₇₀ of the treated sample, B = OD₅₇₀ of the background absorbance, and C = OD₅₇₀ of the reference cells not exposed to the chemical compound being tested. Background absorbance was estimated by lysing a row of reference cells with 1% Triton X-100 before applying MTT.

As an alternative viability test, membrane permeability was probed with 0.4% Trypan blue solution (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Cells loaded with the stain were observed with a hemocytometer and counted as viable (dye excluding) or non viable (stained).

Determination of the cellular death pathways

HeLa cells were exposed or not to 7 μM cadmium and HZR cells were maintained in 200 μM zinc or exposed to 250 μM cadmium for 24 hours. A 10 μl aliquot corresponding to 30 000 cells in fresh medium was stained by addition of 1 μl of a solution containing 100 $\mu\text{g/ml}$ acridine orange (excitation wavelength at 480 nm with a band-width of 40 nm and emission wavelength at 530 with a band-width of 30 nm) and 100 $\mu\text{g/ml}$ ethidium bromide (excitation wavelength at 445 ± 30 nm and emission wavelength at 610 ± 70 nm) in PBS. After 2 min the suspension was spread on a Hausser-Scientific hemacytometer. A minimum of 200 cells was scored with a 40x objective mounted on a fluorescence microscope (Zeiss Axiovert 200 M,, Oberkochen, Germany) and categorized as normal (acridine orange positive with uniform staining of the nucleus), apoptotic (acridine orange positive with highly condensed DNA), late apoptotic (ethidium bromide positive due to plasma membrane damage and acridine orange positive with highly condensed DNA) or necrotic (ethidium bromide positive with uniform staining of the nucleus) (Ribble et al., 2005).

BTC-5N Titration with zinc/cadmium

Fluorescence emission spectra with 410 nm excitation of 2.5 μM 5-nitrobenzothiazole coumarin (BTC-5N, Molecular Probes, Leiden, the Netherlands) with addition of increasing cadmium acetate or zinc acetate concentrations in 5 mM MOPS, pH 7 were recorded with a Jasco FP-6500 fluorescence spectrophotometer. Changes of fluorescence intensity at 520 nm were plotted as a function of the concentration of Cd^{2+} or Zn^{2+} . Apparent dissociation constants (K_d) of the complex between BTC-5N and cadmium or zinc were calculated by: $F = F_{\text{min}} + (F_{\text{max}} - F_{\text{min}}) \times [\text{M}^{2+}] / ([\text{M}^{2+}] + K_d)$. F_{min} is the fluorescence of BTC-5N at $E_m = 520$ nm and F_{max} is the highest value obtained at the end of the titration experiment with the metal.

Localization of intracellular cadmium using confocal microscopy and inverted fluorescence microscopy.

Microscopy of BTC-5N loaded cells was carried out with an inverted fluorescence microscope (Zeiss Axiovert 200 M) and a confocal microscope (Leica TCS-SP2 SE) equipped with a x63 oil-immersion objective. After exposure to metals, cells were incubated for 30 min at 37°C with 2.5 μM BTC-5N/AM in medium containing 121 mM NaCl; 5.4 mM KCl; 0.8 mM MgCl_2 ; 1.8 mM CaCl_2 ; 6 mM NaHCO_3 ; 5.5 mM D-glucose; 25 mM Hepes (pH 7.3) and

then for an additional 30 min in the same medium devoid of the fluorescent probe. Living cells were observed (Ex=410nm, Em=520nm) with the confocal microscope. For nuclear staining, cells were washed three times with PBS and permeabilized with 0.2% Triton X-100 for 5 min. They were incubated with 1.5 μ M of the DNA dye, To-Pro-3 iodide (Molecular Probes), for 5 min before being observed (Ex= 633 nm and Em=661 nm) with the same instrument. Photomultiplier transmission offsets which determined the threshold value of detection were the same for all conditions, only PMT gain (V) differed. Signal amplifications (gain) were 2 fold higher for HeLa and HZR control cells than for cells treated with cadmium in order to obtain images of sufficient quality.

DNA strand break measurements

DNA damage was first evaluated using the Comet assay. Cells were cultured in 100 mm-diameter plates and they were exposed to varying cadmium concentrations for 24 h. Cells were suspended in the culture medium after mild trypsinization and they were mixed with low-melting point agarose (Sigma–Aldrich) at 37°C to obtain a final concentration of 0.5% agarose with about 50 000 cells/mL. The cell suspension was transferred to a microscope slide precoated with a layer of 200 μ L of agarose. Triplicate slides were prepared for each experimental point. After 10 min on ice, the coverslip was gently removed and slides were placed in a tank filled with lysis buffer (NaCl 2.5 M, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)Na₂ 0.1 M, Tris 0.01 M pH 10, N-lauroyl sarcosine 1%, dimethyl sulfoxide 10%, Triton X-100 1%) overnight at 4°C. Slides were transferred into fresh alkaline electrophoresis buffer (NaOH 0.3 M, EDTA 1 mM, pH 13 in deionized water) and electrophoresis was performed at room temperature for 25 min at 25 V. Slides were gently rinsed three times for 5 min with neutralization solution (0.4 M Tris, pH 7.5). DNA on each slide was stained with 50 μ l of 20 μ g/ml ethidium bromide solution in PBS. The slides were covered with a coverslip and stored in the dark at 4°C in a humid atmosphere until analysis. Slides were examined with an epifluorescence microscope (Zeiss Axioskop 20, Carl Zeiss, Microscope Division, Oberkochen, Germany) equipped with a mercury lamp HBO (50 W, 516–560 nm, Zeiss) at 20 \times magnification and linked to a Pulnix TM 765 camera (Kinetic Imaging, Liverpool, UK). A minimum of fifty randomly selected cells per slide and three slides per condition were analyzed with the Komet 3.1 (Kinetic Imaging) image analysis software. The reported genotoxicity parameter is “Tail DNA”, i.e., the percentage of DNA in the comet tail as

compared to the total amount of DNA in the cell using the Komet 3.1 software. Each experiment was repeated three times to estimate standard errors of measurements.

Measurement of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine

HeLa and HZR cells were treated as above for the comet assays and the cell pellets were dried. A chaotropic method (Helbock et al., 1998) was used for DNA extraction. Briefly, 40 million cells were lysed in 1 ml of homogenization buffer (0.15 mM desferrioxamine mesylate, 321 mM Sucrose, 10 mM Tris pH 7.5, 5 mM MgCl₂ and 1% Triton X-100) and centrifuged. The nuclear pellets were suspended in 600 µl of extraction buffer containing 10 mM Tris, 5 mM EDTA, 0.15 mM desferrioxamine mesylate, pH 8, and 0.6% SDS. RNA digestion was performed by the addition of 3 µl ribonuclease A (100 mg/ml) and 8 µl ribonuclease T1 (1 U/µl, Sigma Chemicals Co. St. Louis, MO, USA) at 50°C for 15 min. Then, 15 µl of a *Bacillus* serine protease (Qiagen, Courtaboeuf, France) were added and the mixture was incubated at 37°C for 1 h. The DNA was precipitated in the presence of 1.2 ml of NaI solution (7.6 M NaI, 40 mM Tris, 20 mM EDTA, 0.3 mM desferrioxamine, pH 8) and 2 ml isopropanol by gently inverting the tube several times. DNA was recovered by centrifugation at 5000xg for 15 min at room temperature and washed with 1 ml of 40% isopropanol. The sample was again centrifuged (5 min, 5000xg, room temperature), and the pellet was rinsed by 1 ml ethanol 70%. The DNA pellet was allowed to dry, and the DNA was dissolved in 100 µl of desferrioxamine mesylate 0.1 mM in deionized water. DNA was further hydrolyzed to prepare nucleosides: enzymatic digestions were carried out with 1 µl phosphodiesterase II (4 mU, Sigma) and 5 U nuclease P1 (Sigma, St. Louis, MO) in 200 mM succinic acid, 100 mM CaCl₂, pH 6 for 2 h, at 37°C. Then, 1 µl of phosphodiesterase I (0.003 U, Sigma) and 1 µl of alkaline phosphatase (4 U, Roche Molecular Biomedicals) were added in 12 µl of 500 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8. The solution was further incubated for 2 h at 37°C. Then, 8 µl HCl 0.1 N and 30 µl chloroform were added. After centrifugation, the solution was transferred into high performance liquid chromatography/ electrochemistry (HPLC- EC) injection vials. HPLC-EC measurement of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxo-dG) was performed as previously described (Pouget et al., 1999). For each sample, the amount of DNA injected was estimated using the UV signal recorded on-line for dG after appropriate calibration. The amount of 8-oxo-dG and dGuo was determined by external calibration.

Detection of oxidized proteins:

Electroblotting of soluble proteins was carried out as previously described (Martelli et al., 2007). Oxidized proteins on the nitrocellulose membrane were derivatized with dinitrophenylhydrazine and they were detected with the Protein carbonyl Immunoblot kit (Cell Biolabs, San Diego, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The membrane was blocked with PBS, 0.1 % Tween 20 (PBS-T) containing 5% milk and incubated with rabbit anti- dinitrophenylhydrazone antibody diluted 1:1000 in blocking buffer for 4 h. The membrane was washed with PBS-T and incubated with a secondary antibody, alkaline phosphatase conjugated anti rabbit (1: 5000), for 1 h in blocking buffer and washed repeatedly. The labeled blotted proteins were detected using a chromogenic substrate (Sigma Fast 5-Bromo, 3-Chloro, 3-Indolyl Phosphate/ Nitric Blue Tetrazolium tablet).

Intracellular ROS production:

Intracellular production of reactive oxygen species was assessed using the cell-permeant redox-sensitive probe dihydrodichlorofluorescein diacetate acetyl ester (H₂DCF-DA, Molecular Probes). H₂DCF-DA is converted into DCFH by intracellular esterases and non-fluorescent DCFH is oxidized to the fluorophore dichlorofluorescein DCF by intracellular oxidants (Afzal et al., 2003). Cells were detached from the growth plate by trypsinization and loaded with 5 μ M H₂DCF-DA for 20 min at 37°C in the dark. Cells were then washed with the culture medium to remove excess dye and they were analyzed by flow cytometry using a FACS Calibur system (BD Biosciences) equipped with a laser beam (FL-1; excitation 490 nm; emission 520 nm). The data were obtained as plots of the number of events (counts) as a function of the mean fluorescence (Cell Quest software). Each measurement was performed for a least two independent experiments and it is reported as the mean fluorescence of the cell population.

Measurements of the glutathione levels.

Cells were treated with cadmium or D, L-buthionine S, R-sulfoximine (BSO) for 24 h. Aliquots of the treated cells were individually harvested in triplicate and washed three times with PBS on ice and counted. Calibration curves were established using known GSH concentrations. High-performance liquid chromatography with fluorescence detection (HPLC-FD) was used to determine the total amount of intracellular glutathione in HeLa and HZR cells (Neuschwander-Tetri and Roll, 1989). One million cells were dissolved in 10 mM HCl. After

three cycles of freezing and thawing, the same volume of metaphosphoric acid (6% w/v) was added. For quantification of total glutathione, 1M of dithiothreitol was added. The mixture was centrifuged at 10 000 xg for 7 min at 4°C and the supernatant was diluted 2.5 fold in sodium phosphate buffer (500 mM, pH 7). Two hundred µl of sample were derivatized for 5 min at room temperature with 20 µl *ortho*-phthalaldehyde 10 mM in 100 mM sodium tetraborate buffer (100 mM, pH 9.9). The reaction was neutralized by the same volume of sodium phosphate buffer (500 mM, pH 7) before transferring into HPLC injection vials. The derivatized samples were injected as 100-µl aliquots onto a C18 column (4.6 mm x 250 mm) at a flow rate of 1 ml/min and a column temperature of 28°C. The mobile phase was a gradient of acetonitrile in 50 mM ammonium formate buffer pH 8. Products were detected on-line by fluorescence spectroscopy with the excitation wavelength set at 380 nm and the emission wavelength set at 420 nm.

Intracellular zinc and cadmium determination

Cells were harvested by trypsination and washed twice with PBS without Ca or Mg and once with PBS containing 50 mM EDTA. Pellets were vacuum-dried and mineralized in 70% nitric acid before analysis with Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry (Varian, Vista MPX). The zinc and cadmium content was referred to the amount of cells in the analyzed pellet.

Readily accessible intracellular cadmium was also determined by chelation with BTC-5N. Cells were treated with cadmium as previously described. Cells were incubated for 30 min at 37°C with 2.5 µM BTC-5N/AM in PBS and then for an additional 30 min in the same medium devoid of the fluorescent probe. The BTC-5N fluorescence was measured at a wavelength of 410 nm (excitation) and 520 nm (emission) on a fluorescence spectrophotometer (PTI system 2415, Birmingham, NJ, USA).

Estimation of transcript levels

RNA extractions were carried out with the total Quick RNATM kit (Talent Srl, Trieste, Italy) according to the manufacturer's instructions. Total RNA (1.4 µg) was reverse transcribed by the RevertAidTM H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase (MBI Fermentas, Euromedex, Mundolsheim, France) at 42°C for one hour using a poly-T primer.

In semi-quantitative measurements, complementary DNA was subjected to amplification by PCR under conditions for which the amount of product was proportional to that of template. Using convenient template amounts, 30 replication cycles included denaturation at 94°C for

30 s, annealing for 30 s at the temperature indicated in Table 1, and polymerization at 70°C for 45 s. The PCR products were analyzed on 3.5 % agarose gels (2% for ZnT-1) and stained with SYBR gold (Molecular Probes).

Real-time PCR experiments for the Zip8 transcript were performed with a Stratagene Mx3005P instrument as follows: the reaction mixture consisted of 12.5 µl of Full Velocity SYBR Green QPCR Master Mix (Stratagene), 140 nM of Zip8 primers and 5µl of 12.5 ng cDNA adjusted to 25 µl with RNase free water. The fluorescence of the amplified products was normalized to the signal obtained from the housekeeping gene *ribosomal phosphoprotein PO* for each sample.

Calcium imaging experiments.

Forty five thousand HeLa or HZR cells were plated in 35 mm dishes (Nunc) in 2 ml of culture medium (including 200 µM zinc acetate for HZR cells) 48 hours before assaying. Cells were rinsed twice in Tyrode solution containing 121 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.8 mM MgCl₂, 1.8 mM CaCl₂, 6 mM NaHCO₃, 25 mM HEPES pH 7.4 and 1g/L glucose (Peppiatt et al., 2004). They were incubated for 15 min at 37°C with 5 µM Fluo-4/AM (Molecular Probes) in Tyrode solution, rinsed, and cells were incubated for an additional 30 min in Tyrode solution. Culture dishes were mounted on the stage of an upright Olympus BX51WI microscope equipped with a water immersion 20x objective lens (0.95 NA). The excitation light was provided by a 100 W mercury lamp. Fluorescent images were captured by a cooled digital CCD MicroMax Princeton camera (782 x 582 pixels) and acquired with the MetaFluor (v.4.5, Universal Imaging) software. The shutter was controlled by the shutter driver Uniblitz VMM-D1 (Vincent Associates). The excitation light for Fluo-4 was filtered through a 460-495 nm excitation filter and the emitted light was collected with a 510-550 nm filter. Changes in fluorescence intensity were analyzed off-line in epithelial cell bodies by defining regions of interest. Fluorescence changes, analyzed as a function of time, were expressed as $\Delta F/F$, with F being the baseline fluorescence and delta F the variations of fluorescence.

The data presented were collected from at least 5 different HeLa or HZR cell cultures. On average, 15-25 cells were simultaneously monitored. Data are presented as means \pm standard error of measurement.

Statistical analysis

Experimental results of intracellular zinc and cadmium measures were tested with analysis of Student t-Test for unpaired data with unequal variance.

RESULTS

Cell toxicity and cellular death induced by cadmium.

High Zinc Resistant cells have been shown to withstand higher doses of zinc acetate than HeLa cells: the concentrations at which 50% of the cells were viable after 24 h were 320 μM for the HZR clone and 150 μM for HeLa cells (Chimienti et al., 2001). As an essential metal needed for normal cell proliferation, zinc is not strongly toxic to HeLa cells. In contrast, far smaller concentrations of cadmium induce cell death (Figure 1A). After 24 h-exposure to cadmium, a half-maximal lethal concentration of 7 μM was measured for HeLa cells, as compared to 150 μM for zinc (Chimienti et al., 2001). Therefore, cadmium impacts viability of HeLa cells more strongly than zinc, as generally expected from a toxic metal (Cd) when compared to a biologically relevant one (Zn). Furthermore, after 24 h exposure to the LC_{50} concentration of cadmium a morphological change of HeLa cells was observed (Figure 2). Cells shifted from the irregular multipodal shape of interphase cells into a rounded appearance, as already reported for dying HeLa cells (Rello et al., 2005).

In the case of HZR cells, replacement of the 200 μM zinc acetate by varying cadmium concentrations for 24 h indicated a high cadmium half-maximal lethal concentration of 250 μM (Figure 1B). This value is close to that, 320 μM , previously determined for zinc (Chimienti et al., 2001). Similar results were obtained by measuring viability with the Trypan Blue assay. Therefore, the resistance toward zinc developed by the HZR clone entails these cells with a large insensitivity toward cadmium after 24 h of exposure. Consequently, whereas the ratio between the lethal doses of zinc for the two cell lines is slightly above 2 (320 vs 150 μM) (Chimienti et al., 2001), it is close to 35 in the case of cadmium. The same morphological change observed with HeLa cells applied also to HZR cells at the cadmium concentration corresponding to LC_{50} (Figure 2). When cadmium was applied to the HZR cultures while maintaining the 200 μM zinc concentration, the LC_{50} value was determined at 120 μM of cadmium: summing up both metal concentrations gives a value of 320 μM , in between those determined for zinc alone (320 μM) or cadmium alone (250 μM).

The strong cadmium resistance to toxicity of the HZR clone was investigated for more than 24 h of exposure. Viability tests implementing the Trypan Blue assay were carried out over time in the presence of 100 μM of cadmium acetate replacing the maintenance concentration of zinc acetate. After 48 hours of exposure, only 43% of viable cells remained whereas all cells were found dead after 72 hours (data not shown). The same experiment

carried out with the same doses of zinc did not affect the viability of the HZR cell line. It is thus concluded that the high resistance of HZR cells against cadmium exposure is transient in contrast to that against zinc that does not affect viability in the long run.

Maintenance of HZR cells in a zinc-containing medium may influence their ability to cope with high cadmium concentrations (Szuster-Ciesielska et al., 2000). To assess the role of zinc pre-conditioning associated with metallothionein up-regulation, control HeLa cells were maintained for one week with the sub-lethal concentration of 100 μM zinc before undergoing cadmium exposure for 24 hours. Viability curves were drawn and a half-maximal lethal dose of 10 μM was determined. Therefore, the presence of sub-lethal zinc concentrations in the culture medium for one week has only a marginal influence on subsequent sensitivity to cadmium that does not compare with that developed over time and higher zinc concentrations by HZR cells.

The above viability measurements did not give information about the type of cell death experienced by these cell lines upon exposure to cadmium. Two cadmium concentrations were applied to HeLa cells (2 and 7 μM) and HZR cells (100 and 250 μM) for 24 h and cells were loaded with acridine orange and ethidium bromide. At the lowest cadmium concentrations, apoptosis and necrosis were both observed for HeLa and HZR cells (Table 2). In the case of HeLa cells exposed to the highest cadmium concentration (7 μM), necrosis was the most prominent death pathway, whereas, for HZR cells exposed to 250 μM of cadmium, apoptosis and necrosis were almost equally represented in this cell population (Table 2).

Intracellular localization of cadmium.

In the preceding experiments, HZR cells were shown to withstand higher cadmium concentrations than HeLa cells. For cadmium concentrations at which 50% of the cells were viable, the same morphological changes were observed for both cell lines, but the cellular death pathways were different. It was thus of interest to investigate the precise intracellular localization of cadmium in these cells, since large differences for zinc were observed in this cell line as compared to HeLa cells (Chimienti et al., 2001). For this purpose, a validated fluorescent cadmium probe, BTC-5N (Lindberg et al., 2004), was used to chelate cadmium inside cells and the strongly fluorescent complex was detected by confocal microscopy. However, the binding of BTC-5N to cadmium is as efficient as with zinc (Haugland, 1994), and it may thus be difficult to discriminate between the two metals inside cells. Therefore

quantitative binding data have been obtained for the interaction between zinc or cadmium and BTC-5N.

Titration of BTC-5N (2.5 μ M) was measured by the changes of fluorescence in the presence of either zinc or cadmium (Figure 3). For minute metal concentrations, between 14 and 41 nM, fluorescence of BTC-5N bound to zinc was slightly higher than with cadmium. But the fluorescence rapidly reached a plateau at about 400 nM Zn, a concentration for which the fluorescence of BTC-5N-Cd continued to increase and became more intense than that of BTC-5N-Zn (Figure 3). Moreover, in the case of the cadmium titration the maximal emission wavelength shifted from 515 nm to 504 nm by addition of the metal (data not shown), whereas it remained at the same wavelength for zinc. These titration curves gave dissociation constants of $135 \text{ nM} \pm 36.5$ for zinc and $776 \text{ nM} \pm 135$ for cadmium under our implemented conditions (Figure 3) whereas values of 100 nM for cadmium and 200 nM for zinc have been reported with an estimated precision of 50% (Haugland, 1994).

Despite the slight differences of the above titration curves, BTC-5N is not expected to discriminate between zinc and cadmium. However the zinc and cadmium ligands inside cells, hence the displacement of these metals by BTC-5N, are largely unknown. The changes in fluorescence induced by BTC-5N in the studied cell lines were investigated by fluorescence microscopy.

HeLa cells, with or without 100 μ M zinc, exhibited a diffuse fluorescent background, mainly around the nucleus, corresponding to the labile zinc displaced by the BTC-5N probe (Figure 4 first and second row, first column). No major differences of the average fluorescence intensity were observed between these two conditions. In both cases fluorescent spots were seen in the nucleus (Figure 4 first and second row, first and third column). When HeLa cells were exposed to 2 μ M Cd for 24 hours (Figure 4 third row; first and third column), the fluorescence pattern was slightly different from the one observed with zinc (Figure 4 second row; first column). The fluorescence was also mainly localized around the nucleus but with a clear punctuate pattern suggestive of a vesicular distribution (Figure 4 third row; first and third column). Occasionally some intense spots were also detected in the nucleus, but they may not be specific to cadmium as they were observed with zinc and without added cadmium (Figure 4 second row; first column). The mean intensity of BTC-5N fluorescence (measured as described in Materials and Methods) of Cd-treated cells was increased twofold as compared to cells without Cd.

Although HZR cells were grown with 200 μ M of zinc and contained larger amounts of zinc than HeLa cells (Chimienti et al., 2001), the fluorescence pattern of BTC-5N-loaded cells is very similar to that exhibited by HeLa cells (Figure 4 fourth row; first column) with or without zinc added to the medium. Therefore, most of the intracellular zinc in HZR cells is not accessible to BTC-5N, and this chelator has access to approximately the same zinc amount in both cell lines. Upon exposure to cadmium, confocal images indicated a fluorescence distribution similar to that of HeLa cells (Figures 4 fifth row; first and third column), but with a more heterogeneous pattern in the cytosol suggestive again of a vesicular distribution, and, possibly, of disorganization of some internal organelles, such as the endoplasmic reticulum or the Golgi apparatus (Figures 4 fifth row; first and third column). In the nucleus of HZR cells, fluorescent vesicles containing BTC-5N were seen as with HeLa cells (Figures 4 fifth row; first column).

In both cell lines, the zinc and cadmium fractions that are visualized with BTC-5N share the same localization mainly around the nucleus. However in the case of cells exposed to cadmium the BTC-5N fluorescence displays a more granular pattern suggesting a vesicular distribution.

Reactive oxygen species and oxidative damage to cellular components induced by cadmium

Cadmium may have induced production of reactive oxygen species, by binding and inactivating thiol-containing antioxidant proteins for instance (Klaassen et al., 1999). In order to detect imbalance of redox homeostasis, a direct measure of the cellular content of ROS was carried out.

As shown in Figure 5A, the main DCF fluorescence of HeLa and HZR (maintained in 200 μ M zinc) adherent cells was similar without addition of cadmium (fluorescence mean value ca. 500) for HeLa and 484 for HZR) whereas cadmium treatment increased the level of intracellular ROS in HZR cells in a dose dependant way. When considering the highest cadmium concentrations, ROS production in HeLa cells (795 au) was smaller than in HZR cells (1525 au). So, mean fluorescence obtained for maximal cadmium concentration in HZR cells showed about three fold increased in ROS. Comparable results were obtained with the same probe in murine splenocytes and thymocytes exposed to cadmium (Pathak and Khandelwal, 2006a; Pathak and Khandelwal, 2006b).

The causes of cell death measured in Figure 1 are not known and they may be a consequence of DNA damage since apoptosis is the main death pathway for HZR cells and a non negligible one for HeLa cells (Table 2). In order to determine whether the loss of viability observed upon cadmium exposure was initiated by increased DNA lesions for HeLa cells as compared to HZR ones, the products of DNA oxidation were evaluated by two methods.

Strand breaks determined by the COMET assay

HeLa cells were treated with 2 and 7 μM of cadmium for 24 hours before analysis. The zinc concentration used to maintain the phenotype of HZR cells was replaced by 7 or 250 μM of cadmium for 24 h before harvesting. DNA strand breaks were assessed in adherent cells with the alkaline comet assay. For all applied cadmium concentrations, the mean proportion of DNA found in the tail was below 10%, a value indicating minimal DNA damage. At 7 μM cadmium, DNA damage was the same for HeLa and HZR cells within standard errors of measurements. DNA damage did not significantly increase for both cell lines as a function of extracellular cadmium (Figure 5B). However, when the number of observed cells was plotted as a function of % DNA in the tail, a more heterogeneous distribution appeared at high extracellular cadmium concentrations for HZR cells (not shown). For instance, the proportion of cells with a percentage of DNA in the tail higher than 10% increased from 9.6% for HZR cells maintained in 200 μM zinc to 40% for HZR cells exposed to 250 μM of cadmium. In the case of HeLa cells, the data showed a less heterogeneous distribution (not shown) since the proportion of cells with a percentage of DNA in the tail higher than 10% increased from 15% to 30% between control cells and cells exposed to 7 μM of cadmium.

The low proportion of DNA in the tail in all these experiments may be surprising at first. However adherent cells were selected for analysis in an effort to detect whether DNA damage is an early event triggering death under the implemented conditions. When non-adherent cells were subjected to the Comet assay, as for HZR cells exposed to 250 μM Cd (not shown), the percentage of DNA in the tail was far larger than for adherent cells, as expected for dying cells and as previously observed with apoptotic cells (Rello et al., 2005).

8-Oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine measurements

Another major modification of DNA under oxidative conditions is the oxidation of guanine into 8-oxo-dG. This derivative was measured by HPLC-EC for cells treated without

added cadmium and with a cadmium concentration corresponding to the LC_{50} value at 24 h. Only adherent cells remaining after treatment were examined. No differences within experimental errors were found under all studied conditions for any of the samples (Table 3). From the above series of experiments it can be concluded that the nuclear DNA of both HZR and HeLa adherent cells remaining after 24 hours of cadmium exposure is fairly well protected from the oxidizing conditions induced by cadmium.

Protein oxidation.

Since cadmium did not significantly damage nuclear DNA of adherent HeLa and HZR cells, we investigated the possible consequences of cadmium exposure on protein oxidation. For this purpose, the amount of protein carbonyl functions was measured.

Quantification of hydrazine-derivatized soluble proteins measured by Western blot is shown in figure 5 C. No significant changes of the amount of carbonyl groups were measured for any of the cell lines as a function of cadmium exposure. Furthermore, no significant differences were evidenced between the two cell lines under basal conditions, i.e. with 200 μ M zinc for HZR cells.

Role of glutathione

In order to examine whether glutathione plays a critical cytoprotective role in the cellular response against cadmium, measurements of the cellular glutathione concentration were carried out. In the absence of cadmium, HZR cells maintained in 200 μ M zinc had a ca. three fold higher GSH pool than HeLa cells (Table 4). In the presence of sub-lethal cadmium concentrations (2 μ M for HeLa and 100 μ M for HZR in the absence of zinc for 24 h) glutathione levels did not vary for HeLa cells, whereas they decreased by about 40% for HZR cells. For higher cadmium concentrations leading to 50% cell death (7 μ M for HeLa and 250 μ M for HZR), glutathione levels decreased for both cell lines but to a larger extent for HZR cells with a final glutathione concentrations about three fold smaller than for HZR control cells. However, the GSH pool in HZR cells exposed to 250 μ M cadmium remained nearly 1.5 fold higher than that of HeLa cells exposed to 7 μ M cadmium (Table 4).

The intracellular amount of GSH was decreased by use of BSO, an efficient inhibitor of GSH biosynthesis. HeLa and HZR cells were insensitive to 10 μ M BSO applied alone for 24 h (Figure 6), whereas cell viability was affected by 50 μ M BSO resulting in ca. 60% of viable cells after 24 h for both cell lines (data not shown). When 1.25 μ M of cadmium were applied to the culture medium in addition to 10 μ M BSO for 24 hours, HeLa cells viability

decreased to 50% (Figure 6). The same loss of viability for HZR cells pretreated with 10 μ M BSO was measured at 55 μ M cadmium, a usually safe concentration of toxic metal for these cells (Figure 6). The ratios between viabilities in the presence of cadmium without and with addition of 10 μ M BSO were calculated for both cell types. This parameter revealed that the effect of BSO addition on cadmium-induced lethality was similar in HZR cells ($250/55=4.5$) and HeLa cells ($7/1.25=5.6$). These observations are a strong indication that glutathione, as an antioxidant molecule and a potential metal ligand, does play an important protective role against cadmium for both cell lines.

The presence of individually sub-lethal 10 μ M BSO and 2 and 100 μ M cadmium concentrations for HeLa and HZR cells, respectively, decreased the glutathione pool more strongly for HZR cells (36 fold) than for HeLa cells (3.5 fold). This result (Table 4) confirms that GSH is involved in cadmium detoxification in the studied cell lines, and that HZR cells are more dependent on the turnover of the tripeptide than HeLa cells to resist to toxic concentrations inducing the same proportion of cell death.

Intracellular cadmium measurements and cadmium resistance of HZR cells

The very large difference between the lethal doses for cadmium at 24 h exhibited by the two cell lines can be explained by a variety of mechanisms. To get insight into the different responses of these cell lines toward cadmium exposure, intracellular concentrations of the toxic metal were measured by ICP-OES. HeLa and HZR cells were exposed to a range of cadmium concentrations for 24 hours and the dried cell pellets were analyzed after washing.

Exposure to 5 μ M and 100 μ M cadmium for HeLa and HZR cells corresponded to 4.3 and 6 nmol of intracellular Cd per million of viable cells, respectively (Figure 7A). At higher extracellular concentrations (10 and 200 μ M), intracellular cadmium amounted to 7 and 8.3 nmol per million of cells for HeLa and HZR cell lines, respectively. This intracellular cadmium increase in HZR cells was paralleled by a significant decrease of intracellular zinc, from 4.3 nmol per million of cells for HZR cells maintained in 200 μ M zinc to 0.6 nmol per million of cells for HZR cells exposed to 200 μ M cadmium for 24 h (Figure 7B). In contrast no changes in intracellular zinc were observed in HeLa cells exposed to cadmium or not. Therefore, the intracellular cadmium content is approximately the same for both cell lines under conditions providing a ca. 20 fold higher exposure in the case of HZR cells. It thus appears that HZR cells display a high cadmium resistance by maintaining the intracellular cadmium

concentration at a low level notwithstanding the very large amount present in the extracellular medium. The comparison of intracellular cadmium concentrations between the two cell lines was also undertaken using the cell-permeable fluorescent dye BTC-5N/AM (Jeon et al., 2004). The proportion of BTC-5N fluorescence due to cadmium binding was similar for HeLa and HZR cells when the latter were exposed to ca. 20 fold higher concentrations than for the former (Figure 7C). From the above data, it can be concluded that HZR cells can sustain ca. 20 fold higher cadmium concentrations in the extracellular medium than HeLa cells by avoiding intracellular cadmium accumulation, but that they remain sensitive to the toxic metal penetrating inside cells.

Role of efflux proteins in cadmium resistance

Since HZR cells efficiently limit the increase in intracellular cadmium concentrations (Figure 7A) and rely on GSH to resist to the metal, we examined the possibility of a particularly efficient cadmium efflux system, possibly involving GSH (Vernhet et al., 1999), in HZR cells. Some of the most widespread efflux pumps were probed by semi-quantitative RT-PCR. Levels of transcripts of MRP1 and 2, MVP, and P-glycoprotein were measured under standard growth conditions for both cell lines. These proteins participate in the efflux of cytotoxic compounds, including cadmium in *Caenorhabditis elegans* (Broeks et al., 1996) and *Drosophila melanogaster* (Callaghan and Denny, 2002), and lead to a decreased cellular drug accumulation and toxicity (Leslie et al., 2005). The PCR bands of each transcript in the linear range of amplification were quantified and they were normalized to that of β -actin (Figure 8A). The levels of any of the analyzed transcripts were not significantly different in HeLa and HZR cells. Therefore different expression levels of any of these detoxifying enzymes between HeLa and HZR cells are not responsible for the resistance to high zinc concentrations and for keeping the cadmium concentrations at low levels in HZR cells exposed to high doses of the toxic metal.

ZnT-1 is a protein of the Cation Diffusion Facilitator family located in the plasma membrane. It is mainly responsible for maintaining intracellular zinc concentrations by exporting excess of metal from the cytosol. ZnT-1 is upregulated by zinc via Metal Transcription Factor-1 binding to Metal Responsive Element(s) in the 5' UTR of its gene (Langmade et al., 2000). As expected ZnT-1 expression is higher in HZR cells maintained in 200 μ M zinc than in HeLa cells (Figure 8B). To further compare ZnT-1 transcripts in HeLa and HZR cells, the added zinc concentration was removed from the HZR culture medium for

24 hours before analysis. The level of the ZnT-1 transcript in these HZR cells was decreased as compared to its level in zinc-enriched medium but it remained slightly higher than that in HeLa cells. Yet, the difference did not reach significance between ZnT-1 levels in HeLa and HZR cells kept for at least 24 h in media containing the same amount of zinc (Figure 8B). Therefore, as for the efflux pumps, major up-regulation of the main zinc exporter does not seem responsible for maintaining low intracellular cadmium concentrations in HZR cells.

Possible pathways of cadmium uptake

Since cadmium is not a physiological element, it has to enter cells via one or several pathways devoted to other purposes. Because cadmium and calcium share similar ionic radii, the possibility of cadmium uptake through calcium channels was considered. T-type calcium channel subunit α_{1G} transcript level has been investigated since it has been previously shown to mediate Cd^{2+} entry into fibroblast cells (Leslie et al., 2006). The level of the $\text{Ca}_{\text{v}}\alpha_{1G}$ transcript was identical in both cell lines under standard culture conditions (Figure 9). Therefore, decreased cadmium uptake by $\text{Ca}_{\text{v}}\alpha_{1G}$ repression in HZR cells cannot be associated with the increased resistance of this cell line to cadmium exposure.

However, alternative channels may be used by cadmium. Such pathways were probed by monitoring ionic fluxes using the calcium sensitive probe Fluo-4. The cells were bathed in a Ca^{2+} -Tyrode solution and 100 μM cadmium chloride were applied to cells (Figure 10 A circle). Rapidly after cadmium addition, fluorescence in HeLa cells steadily increased. The same experiment was performed with HeLa cells bathed in a Ca^{2+} -free Tyrode solution (Figure 10 B white square). Upon cadmium addition, fluorescence also increased in the absence of calcium. The increase of signal intensity was thus independent of extracellular calcium. By analogy with Fluo-3 (Nishimura et al., 2006), increased fluorescence is expected with either calcium or cadmium binding to Fluo-4. However, since the signal observed in Figure 10 for HeLa cells does not depend on the calcium fluxes, it is most probably due to cadmium entry into cells and formation of the cadmium-Fluo-4 complex.

In the case of HZR cells incubated in the Ca^{2+} -Tyrode solution, the addition of cadmium induced a fluorescence decrease of about 10% (Figure 10 A triangle). This may be due to a small transient imbalance between inward and outward calcium fluxes. The lack of increased fluorescence in HZR cells strongly contrasts with the behavior of HeLa cells and it is a direct observation of HZR cells ability to avoid deleterious cadmium uptake, or cadmium-triggered intra-cytosolic calcium increase, over the studied time range.

The cadmium uptake pathways in animal cells are generally not well known. It has been proposed that cadmium may use a manganese transporter to enter into cells (He et al., 2006; Himeno et al., 2002; Martin et al., 2006a). Manganese was added to the extracellular solution containing cadmium in a Cd:Mn = 10:1 molar ratio. The fluorescence increase occurring upon cadmium addition to the cells was slightly inhibited in the presence of Mn, whether calcium was provided or not. The Zip8 protein, belonging to the Zip family of Zrt-like Irt-like proteins, has been recently shown to account for genetic differences in the response to cadmium damage in mice testis (Dalton et al., 2005) and to be an efficient Mn transporter (He et al., 2006). Relative levels of Zip8 transcripts were measured under standard growth conditions and they were not found to vary between HeLa and HZR cell lines. Therefore it is unlikely that Zip8 down-regulation is responsible for the decreased influx of cadmium in HZR cells (Figure 9).

DISCUSSION

A previously obtained HeLa sub-cell line called HZR (Chimienti et al., 2001) was shown to sustain relatively high concentrations of zinc (200 μ M) for 24 h which is lethal for most cell types including the parent HeLa cell line. Since zinc and cadmium share many chemical properties, the resistance of the HZR (zinc-resistant) clone toward cadmium exposure was investigated.

In the present study, we demonstrate that high zinc resistant cells are also highly resistant to cadmium exposure for 24 hours ($LC_{50}=250$ μ M), contrary to parental HeLa cells that are rapidly killed by a few μ M of the toxic metal (Figure 1). Moreover, the ratio between the lethal doses of zinc for the two cell lines is slightly above 2, whereas it is close to 35 in the case of cadmium. Indeed, it seems that resistance toward zinc developed by HZR cells endows them with a large insensitivity toward cadmium for 24 hours of exposure. However the resistance of HZR cells toward cadmium is transient, since HZR cells do not withstand sub-lethal cadmium concentrations at 24 h for more than 3 days, whereas they are routinely maintained in similar zinc concentrations. Therefore, progressive poisoning of HZR cells by cadmium occurs despite persistent resistance when exposed to high zinc concentrations.

The zinc amounts accumulated in HZR cells (Figure 7) may be considered to be responsible for resistance to high cadmium concentrations. Indeed, zinc pre-treatment of a rat hepatic stellate cell line decreases cadmium toxicity (Souza et al., 2004). Similar experimental conditions applied to HeLa cells also improved their resistance against cadmium but only a

minor shift of the LC_{50} value at 24 h was observed. In a reciprocal way, withdrawal of zinc prior to cadmium exposure dramatically increased the sensitivity of HZR cells to cadmium. This observation is to be compared to the zinc resistance phenotype of HZR cells which is also reversible upon zinc withdrawal, with loss of both intracellular zinc and resistance to zinc toxicity (Chimienti et al., 2001). However, the intracellular zinc concentration returns to basal values in HZR cells as early as 24 h after removal of added zinc in the medium and substitution by cadmium (Figure 7). Therefore, the kinetics of intracellular zinc depletion is faster than the loss of cadmium resistance, which implies that increased intracellular zinc cannot fully explain the spectacular cadmium resistance of HZR cells.

It was of interest to localize cadmium in HeLa and HZR cells in order to estimate whether different metal sequestration means would explain different sensitivities to Cd toxicity. For this purpose, BTC-5N was used to detect intracellular cadmium, as already done in protoplasts (Lindberg et al., 2004) and in the U937 human monocytic cell line (Jeon et al., 2004). The relative selectivity of this chelator between zinc and cadmium was not previously detailed. We have measured formation of the 1:1 complexes for both metals and comparable dissociation constants were determined, as well as a moderate shift in fluorescence emission wavelength in the case of cadmium only (Figure 3). However, cadmium treatment increased the fluorescence intensity of BTC-5N loaded-cells and a significant part of the increased fluorescence was found in vesicles. This indicates that cadmium is similarly managed by both cell lines and that the toxic metal remains accessible to the BTC-5N chelator inside cells, in contrast to zinc that does not seem to contribute to the fluorescence of loaded cells in proportion of either the applied or the intracellular concentrations (Figure 4 fifth and sixth row; first and third column). It appears likely that GSH is associated with intracellular cadmium since inhibition of its synthesis impacts viability (Figure 6) and GSH may be a cadmium ligand displaced by BTC-5N inside cells.

The pro-oxidant properties of cadmium have been widely demonstrated in various cellular contexts and they most probably contribute to the toxic effects of the metal in the present case. However, it is remarkable that DNA damage and protein oxidation have not been found to be significantly different between the two studied cell lines, at least in the fraction of the cell populations that remains adherent upon cadmium exposure. It must then be concluded that massive oxidation of the genome and proteome are not initial events of cadmium toxicity in the present case.

From the data reported here, the similar lethal concentration values for zinc and cadmium at 24 h displayed by HZR cells are not due to similar managements of the two metal ions by these cells. Whereas zinc is accumulated in large proportions (Chimienti et al., 2001) (Figure 7), HZR cells stringently avoid cadmium build-up. As a result, HeLa and HZR cells have the same intracellular cadmium content after being exposed to extracellular cadmium concentrations differing by at least one order of magnitude. Therefore, the significant upregulation of metallothioneins occurring in HZR cells (Chimienti et al., 2001) is not exclusively responsible for resistance to cadmium. Similarly, preconditioning of HeLa cells with zinc, and induction of metallothioneins, has only a marginal effect on cadmium resistance.

Keeping low intracellular cadmium concentrations in HZR cells upon exposure to high external amounts is not a consequence of transcriptional up-regulation of the major efflux pumps involved in expelling toxic molecules, including heavy metals (Leslie et al., 2005). This implies that the involvement of GSH in handling intracellular cadmium is not mainly due to the formation of substrates for ATP-dependant multi-drug resistance-associated proteins.

The HZR clone was developed by exposure to high zinc doses and it is maintained in a medium enriched with this metal above the lethal concentration for parental HeLa cells. Therefore, up-regulation of ZnT-1, the main zinc exporter from cytosol (Cousins et al., 2006a), is expected under the normal growth conditions of HZR cells (Figure 8B). Still, efficient zinc export does not counterbalance zinc accumulation in these cells (Chimienti et al., 2001) (Figure 7). Once zinc is removed from the medium for 24 h, intracellular zinc sharply decreases (Figure 7) and ZnT-1 expression is no longer significantly different from that in HeLa cells (Figure 8B). Yet, it takes an additional 24 h for the viability of HZR cells to decrease to ca. 50% with large, i.e. 100 μ M, concentrations of cadmium. It is thus unlikely that outward transport of cadmium by ZnT-1 fully explains resistance of HZR cells, all the more so as transport of cadmium by ZnT-1 has never been reported.

Furthermore, ion traffic imaging with the Fluo-4 probe indicated that, instead of enhanced export of metals, HZR cells stringently limit cadmium uptake (Figure 10), over a short (less than 30 min) lapse time at least. Recently, the ZnT-1 membrane protein was proposed to play a regulatory role in cation-entry via L-type calcium channels (Ohana et al., 2006). In neurons and several cell lines, ZnT-1 down-regulation increases calcium, zinc, and cadmium entry (Ohana et al., 2006). Following the same rationale, decreased cadmium uptake in HZR cells would be triggered by increased ZnT-1 expression, but massive over-expression of ZnT-1 has

not been clearly evidenced in these cadmium resistant cells (Figure 8A) and it is unlikely to fully explain their ability to limit the uptake of this metal.

Zip8 has been lately identified as a probable manganese-carbonate symporter that transports cadmium with high affinity (He et al., 2006). Indeed, manganese addition to the cadmium-containing extracellular solution of Fluo-4-loaded HeLa cells diminishes cadmium influx in our experimental setting. However, Zip8 down-regulation cannot be assigned a major role in preventing cadmium uptake by HZR cells since Zip8 expression is independent of the presence of zinc, it is present in HZR cells, and it is only slightly different between HeLa and HZR cells (Figure 9).

Therefore all previously identified cadmium transporters do not seem to account for efficient cadmium uptake in HeLa cells. The inhibition of these known mediators of cadmium uptake is also unlikely to explain cadmium resistance of HZR cells. These data show that, in view of the diversity of cadmium targets and effects, a comprehensive description of cadmium toxicity remains to be provided. Elucidating the mechanisms at work in HZR cells may thus highlight unprecedented pathways and clarify the zinc-cadmium connections in cells.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from the 'Toxicologie Nucléaire et Environnementale' program. The authors thank Dr Didier Grunwald and Véronique Collin-Faure for access to the cellular imaging and flow cytometry facilities of IRTSV, respectively, and for advice on their use. The HZR cell line and advice on its use were kindly provided by Dr Fabrice Chimienti and Dr Michel Sève.

REFERENCES

- Afzal, M., S. Matsugo, et al. (2003). "Method to overcome photoreaction, a serious drawback to the use of dichlorofluorescein in evaluation of reactive oxygen species." *Biochem Biophys Res Commun* **304**(4): 619-24.
- Beyersmann, D. and S. Hechtenberg (1997). "Cadmium, gene regulation, and cellular signalling in mammalian cells." *Toxicol Appl Pharmacol* **144**(2): 247-61.
- Bridges, C. C. and R. K. Zalups (2005). "Molecular and ionic mimicry and the transport of toxic metals." *Toxicol Appl Pharmacol* **204**(3): 274-308.
- Broeks, A., B. Gerrard, et al. (1996). "Homologues of the human multidrug resistance genes MRP and MDR contribute to heavy metal resistance in the soil nematode *Caenorhabditis elegans*." *Embo J* **15**(22): 6132-43.
- Callaghan, A. and N. Denny (2002). "Evidence for an interaction between p-glycoprotein and cadmium toxicity in cadmium-resistant and -susceptible strains of *Drosophila melanogaster*." *Ecotoxicol Environ Saf* **52**(3): 211-3.
- Carmichael, J., W. G. DeGraff, et al. (1987). "Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing." *Cancer Res* **47**(4): 936-42.
- Chimienti, F., E. Jourdan, et al. (2001). "Zinc resistance impairs sensitivity to oxidative stress in HeLa cells: protection through metallothioneins expression." *Free Radic Biol Med* **31**(10): 1179-90.
- Cousins, R. J., J. P. Liuzzi, et al. (2006). "Mammalian zinc transport, trafficking, and signals." *J Biol Chem* **281**(34): 24085-9.
- Dalton, T. P., L. He, et al. (2005). "Identification of mouse SLC39A8 as the transporter responsible for cadmium-induced toxicity in the testis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(9): 3401-6.
- Haugland, R. P. (1994). "Spectra of fluorescent dyes used in flow cytometry." *Methods Cell Biol* **42 Pt B**: 641-63.
- He, L., K. Girijashanker, et al. (2006). "ZIP8, member of the solute-carrier-39 (SLC39) metal-transporter family: characterization of transporter properties." *Mol Pharmacol* **70**(1): 171-80.
- Helbock, H. J., K. B. Beckman, et al. (1998). "DNA oxidation matters: the HPLC-electrochemical detection assay of 8-oxo-deoxyguanosine and 8-oxo-guanine." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(1): 288-93.
- Himeno, S., T. Yanagiya, et al. (2002). "Cellular cadmium uptake mediated by the transport system for manganese." *Tohoku J Exp Med* **196**(1): 43-50.
- Jeon, H. K., H. S. Jin, et al. (2004). "Proteome analysis associated with cadmium adaptation in U937 cells: identification of calbindin-D28k as a secondary cadmium-responsive protein that confers resistance to cadmium-induced apoptosis." *J Biol Chem* **279**(30): 31575-83.
- Klaassen, C. D., J. Liu, et al. (1999). "Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **39**: 267-94.
- Langmade, S. J., R. Ravindra, et al. (2000). "The transcription factor MTF-1 mediates metal regulation of the mouse ZnT1 gene." *J Biol Chem* **275**(44): 34803-9.
- Leslie, E. M., R. G. Deeley, et al. (2005). "Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense." *Toxicol Appl Pharmacol* **204**(3): 216-37.
- Leslie, E. M., J. Liu, et al. (2006). "Acquired cadmium resistance in metallothionein-I/II(-/-) knockout cells: role of the T-type calcium channel Ca α 1G in cadmium uptake." *Mol Pharmacol* **69**(2): 629-39.
- Lindberg, S., T. Landberg, et al. (2004). "A new method to detect cadmium uptake in protoplasts." *Planta* **219**(3): 526-32.
- Martelli, A., E. Rousselet, et al. (2006). "Cadmium toxicity in animal cells by interference with essential metals." *Biochimie* **88**(11): 1807-14.
- Martelli, A., B. Salin, et al. (2007). "Folding and turnover of human iron regulatory protein 1 depend on its subcellular localization." *Febs J* **274**(4): 1083-92.
- Martin, P., M. Fareh, et al. (2006). "Manganese is highly effective in protecting cells from cadmium intoxication." *Biochem Biophys Res Commun* **351**(1): 294-9.
- Neuschwander-Tetri, B. A. and F. J. Roll (1989). "Glutathione measurement by high-performance liquid chromatography separation and fluorometric detection of the glutathione-orthophthalaldehyde adduct." *Anal Biochem* **179**(2): 236-41.
- Nishimura, Y., J. Y. Yamaguchi, et al. (2006). "Increase in intracellular Cd(2+) concentration of rat cerebellar granule neurons incubated with cadmium chloride: cadmium cytotoxicity under external Ca(2+)-free condition." *Toxicol In Vitro* **20**(2): 211-6.
- Ohana, E., I. Sekler, et al. (2006). "Silencing of ZnT-1 expression enhances heavy metal influx and toxicity." *J Mol Med* **84**(9): 753-63.

- Pathak, N. and S. Khandelwal (2006). "Influence of cadmium on murine thymocytes: potentiation of apoptosis and oxidative stress." *Toxicol Lett* **165**(2): 121-32.
- Pathak, N. and S. Khandelwal (2006). "Oxidative stress and apoptotic changes in murine splenocytes exposed to cadmium." *Toxicology* **220**(1): 26-36.
- Peppiatt, C. M., A. M. Holmes, et al. (2004). "Calmidazolium and arachidonate activate a calcium entry pathway that is distinct from store-operated calcium influx in HeLa cells." *Biochem J* **381**(Pt 3): 929-39.
- Pouget, J. P., J. L. Ravanat, et al. (1999). "Measurement of DNA base damage in cells exposed to low doses of gamma-radiation: comparison between the HPLC-EC and comet assays." *Int J Radiat Biol* **75**(1): 51-8.
- Rello, S., J. C. Stockert, et al. (2005). "Morphological criteria to distinguish cell death induced by apoptotic and necrotic treatments." *Apoptosis* **10**(1): 201-8.
- Ribble, D., N. B. Goldstein, et al. (2005). "A simple technique for quantifying apoptosis in 96-well plates." *BMC Biotechnol* **5**: 12.
- Satarug, S., J. R. Baker, et al. (2003). "A global perspective on cadmium pollution and toxicity in non-occupationally exposed population." *Toxicol Lett* **137**(1-2): 65-83.
- Saydam, N., T. K. Adams, et al. (2002). "Regulation of metallothionein transcription by the metal-responsive transcription factor MTF-1: identification of signal transduction cascades that control metal-inducible transcription." *J Biol Chem* **277**(23): 20438-45.
- Souza, V., C. Escobar Mdel, et al. (2004). "Zinc pretreatment prevents hepatic stellate cells from cadmium-produced oxidative damage." *Cell Biol Toxicol* **20**(4): 241-51.
- Szuster-Ciesielska, A., A. Stachura, et al. (2000). "The inhibitory effect of zinc on cadmium-induced cell apoptosis and reactive oxygen species (ROS) production in cell cultures." *Toxicology* **145**(2-3): 159-71.
- Vernhet, L., A. Courtois, et al. (1999). "Overexpression of the multidrug resistance-associated protein (MRP1) in human heavy metal-selected tumor cells." *FEBS Lett* **443**(3): 321-5.
- Zhang, B., O. Georgiev, et al. (2003). "Activity of metal-responsive transcription factor 1 by toxic heavy metals and H₂O₂ in vitro is modulated by metallothionein." *Mol Cell Biol* **23**(23): 8471-85.

Table 1. Oligonucleotide primers used for RT-PCR

Primer Name	GenBank accession number	Sequence 5'→3'	Product Size (bp)	Annealing temperature
ZnT-1 (SLC30A1)	AF 323590	-CCCCAGAAGTGGTGATACAGTGG- (F) -CTGCTTCCAGCAAGTTGCCA- (R)	510	56 °C
P-gp (ABC B1)	AY 910577	-TGCGACAGGAGATAGGCTG- (F) -GCCAAAATCACAAGGGTTAGCTT- (R)	193	57.5°C
Lrp (MVP)	NM 017458	-GGGCTTGGTGCTGTTTGATG- (F) -CGCCTTTAGATGGAGGGCA- (R)	166	57.5°C
MRP1 (ABC C1)	NM 019901	-CTTGCCACGTACATTAACATGAT- (F) -CCGATTGTCTTTGCTCTTCATG- (R)	196	57.5°C
MRP2 (ABC C2)	NM 000392	-CCACTTTGTTTTGAGCAAAGTGT- (F) -CCAGCTCTATGGCTGCTAGAA- (R)	181	57.5°C
β-actin	AY 582799	-CCAAGGCCAACC GCGAGAAGATGAC- (F) -AGGGTACATGGTGGTGCCGCCAGAC- (R)	600	57.5°C
Zip 8 (SLC39A8)	NM 022154	-GCTGGCTATTGGGACTCTTT- (F) -AAATCCACCAAACACAGCAA- (R)	118	57.5°C
CACNα _{1G} (ABC C2)	NM 198382	-ACCTGGGAGACACTTGGAAC- (F) -GCTGAGAAGCTGACGTTCTG- (R)	94	61.5°C

Table 2. Quantitative analysis of cadmium induced cell death in HeLa and HZR cells.

Cells were treated with different Cd concentrations for 24 h and stained with acridine orange and ethidium bromide. The numbers of apoptotic, late apoptotic, or necrotic cells were measured by microscopic examination. HZR control cells were maintained in 200 μ M zinc.

	Live (%)	Apoptosis (%)	Necrosis (%)	Membrane permeability and condensed chromatin (%)
HeLa control	85.1	4.9	7.1	2.9
HeLa 2 μ M Cd	70.4	5.1	16.9	7.6
HeLa 7 μ M Cd	63.3	0	35	1.7
HZR Control	81.1	4.8	8.9	5.2
HZR 100 μ M Cd	69.4	4.8	16.6	9.2
HZR 250 μ M Cd	49.6	20.2	20.6	9.6

Table 3. 8 oxo-dG formation under cadmium exposure in HeLa and HZR cells.

HeLa and HZR cell lines were treated with cadmium and 8 oxo-guanine measurements were carried out as described in Materials and Methods. The reported data are the mean \pm SD of three independent experiments made in triplicate.

	Cadmium (μ M)	Mean 8oxo Gua/ 10^6 bases
HeLa	0	1.55 ± 0.36
	7	1.24 ± 0.27
HZR	200 μ M zinc	1.53 ± 0.43
	250	1.87 ± 0.34

Table 4: Glutathione levels under cadmium exposure

The reported values have been obtained from three independent measurements.

	GSH (pmol/10 ⁵ cells)
HeLa control	3453 ± 527
HeLa 2µM Cd	3470 ± 265
HeLa 7µM Cd	2399 ± 210
HeLa 2µM Cd + 10 µM BSO	934 ± 41
HZR 200 µM zinc	9924 ± 620
HZR 100 µM Cd	5757 ± 296
HZR 250 µM Cd	3704 ± 624
HZR 100 µM Cd + 10 µM BSO	275 ± 7

FIGURE LEGENDS

Figure 1 Cadmium effect on cell viability.

Parental HeLa (A) and High Zinc Resistant HeLa cells (B) were treated with increasing concentrations of cadmium acetate in the culture medium for 24 hours. For HZR cells, 200 μM of zinc acetate used to maintain these cells were replaced by cadmium 24 h before measuring viability. Viable cells were measured by the MTT assay. The results are reported as percentage of the number of viable cells not exposed to cadmium. Standard deviation for each point was calculated from measurements done in quadruplicate in four independent experiments. Experimental data were fitted to a sigmoid curve from which LC_{50} values were derived as the 50% intersecting points.

Figure 2 Morphologies of parental HeLa and HZR cells.

HeLa and HZR cells were exposed to 7 μM and 250 μM cadmium concentrations for 24 hours, respectively. Adherent cells were observed by phase contrast with the inverted fluorescence microscope.

Figure 3 Interactions between zinc or cadmium and BTC-5N

Experiments were carried out with 2.5 μM BTC-5N in 5 mM MOPS, pH=7, T= 22°C, with fluorescence excitation at 410 nm. Fluorescence emission spectra upon addition of increasing concentrations of cadmium acetate (■) or zinc acetate (Δ) were recorded. The apparent dissociation constants of the $[\text{M}^{n+}\text{BTC-5N}]$ complex where M^{n+} is cadmium or zinc were determined. K_d were estimated from $F = F_{\text{min}} + (F_{\text{max}} - F_{\text{min}}) \times [\text{M}^{n+}] / ([\text{M}^{n+}] + K_d)$ in which F is the measured emission fluorescence at 515 nm. F_{min} is the fluorescence of the BTC-5N probe and F_{max} that obtained at the end of the titration. K_d = 170 nM for zinc and 800 nM for cadmium.

Figure 4 Confocal microscopy of zinc and cadmium exposed cells

Living cells were loaded with BTC-5N (green fluorescence in the left column), they were then permeabilized and loaded with To-Pro to locate the nucleus (red fluorescence in the central second column). The pictures in the right column are the merges of the two stains. Bars represented on each picture correspond to 20 μm

HeLa cells were treated without and with 100 μM zinc for 24 hours in the first and second lines, respectively. The mean intensity of fluorescence was approximately the same for

control and treated cells. The third line corresponds to adherent HeLa cells treated with 2 μM Cd for 24 hours. The mean intensity of BTC-5N fluorescence of Cd-treated HeLa cells was ca. twofold increased as compared to untreated or zinc exposed cells. The fourth line corresponds to adherent HZR cells maintained in 200 μM zinc and the last two lines to adherent HZR cells treated with 100 μM cadmium for 24 hours. As in the case of HeLa cells, the mean intensity of BTC-5N fluorescence of Cd treated cells was twofold higher than for zinc treated cells.

Figure 5

Generation of ROS by cadmium in HeLa and HZR cells (A). Cells (1.5×10^6) were incubated with $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ and DCF fluorescence was measured by flow cytometer with FL-1 filter. HeLa cells were exposed for 24 hours to 2 and 7 μM cadmium (open bars) and HZR cells were treated the same way with 100 and 250 μM cadmium (filled bars). Two experiments were done and gave similar results.

DNA strand breaks of cadmium treated cells measured by the alkaline comet assay (B). Percentage of DNA in the tail of the comet is reported as a function of the extracellular cadmium concentration for HeLa (open bars) and HZR (filled bars) cells.

Detection of oxidized proteins in HeLa and HZR cells treated with different concentrations of cadmium for 24 hours (C). Two western blots were processed using 50 μg and 30 μg of total soluble proteins and were electrophoresed in a 12% acrylamide gel. Oxidized proteins were revealed with a Protein carbonyl Immunoblot kit as described in Materials and Methods. Histogram represents signal quantification of oxidized proteins related to cadmium concentration exposure for HeLa cells (open bars) and HZR cells (filled bars). HZR control cells were maintained in 200 μM zinc acetate that was replaced by cadmium 24 h before analysis. Each bar represents mean S.D ($n=2$) of the signal ratio between proteins from treated cells and from control HeLa cells.

Figure 6 Viability of HeLa and HZR cells exposed to cadmium in the presence of BSO

The percentage of viable cells is reported for HeLa cells (left, open bars) and HZR cells (right, filled bars) with reference to non treated cells set at 100%. Measurements were carried out with the indicated cadmium concentrations in the presence of 10 μM BSO for 24 hours.

Four independent experiments in quadruplicate were done in order to determine the standard deviation for each point.

Figure 7 Intracellular zinc and cadmium concentrations in HeLa and HZR cells

The cellular cadmium (A) and zinc (B) content was measured on washed and dried pellets by Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometry. HeLa (open bars) and HZR cells (filled bars) were exposed for 24 hours to the concentrations of cadmium indicated on the horizontal axis. HZR control cells were maintained in 200 μ M zinc. Five independent experiments were used to draw the graphs. The cadmium increase in HeLa and HZR cells exposed to cadmium and the zinc decrease in HZR cells exposed to cadmium are statistically significant as compared to controls ($p < 0.003$).

In panel (C) cells were stained with BTC-5N/AM and the fluorescence was measured. The ratio of fluorescence values obtained for cadmium-treated cells was divided by that of untreated cells and plotted.

Figure 8 Semi-quantitative PCR estimates of major efflux pumps

Reverse transcriptase - polymerase chain reaction experiments were carried out with total RNA purified from HeLa and High Zinc Resistant cells. Three independent polymerase chain reactions were performed for each sample. (A) The position of size markers in bp is indicated on the right scale and a representative agarose gel is shown. The ratio of each signal is reported to that of β -actin, in arbitrary units since a lower amount of cDNA was used for β -actin amplification. Data are for HeLa cells (empty bars) and HZR (filled bars). (B) The same experiment was carried out for ZnT1. In this case, the 200 μ M zinc concentration was also removed from the medium of HZR cells 24 hours before harvest to give the data represented as hatched bars. The measurements were otherwise performed as for the other transporters.

Figure 9 Estimates of the Zip8 and Cacn α_{1G} transcripts.

(A) The conditions used for reverse transcriptase polymerase chain reaction experiments are similar to those in the legend of Figure efflux. (B) mRNA levels of Zip8 were also determined by quantitative PCR for HeLa cells (HeLa, empty bar), HZR cells harvested after one week without zinc added to the culture medium (HZR-Zn, grey bar), and HZR kept in the usual culture medium containing 200 μ M zinc (HZR, filled bar). Data are the mean \pm SEM ($n \geq 3$) and were obtained as described in Materials and Methods.

Figure 10 Ions traffic in HeLa and HZR cells exposed to cadmium detected with Fluo-4

Graph (A) shows relative Fluo-4 changes as a function of time in response to the external application of 100 μM cadmium for HeLa (circles $n=166$ cells) and HZR cells (triangles $n=110$ cells) with 2 mM Ca^{2+} in the external medium. (B) HeLa cells response to the external application of 100 μM cadmium was followed for 30 min with (black circle symbols $n=44$ cells) or without (white square symbols $n=36$ cells) 2 mM Ca^{2+} in the external medium. For clarity only one every 2 recorded points is plotted in panel B.

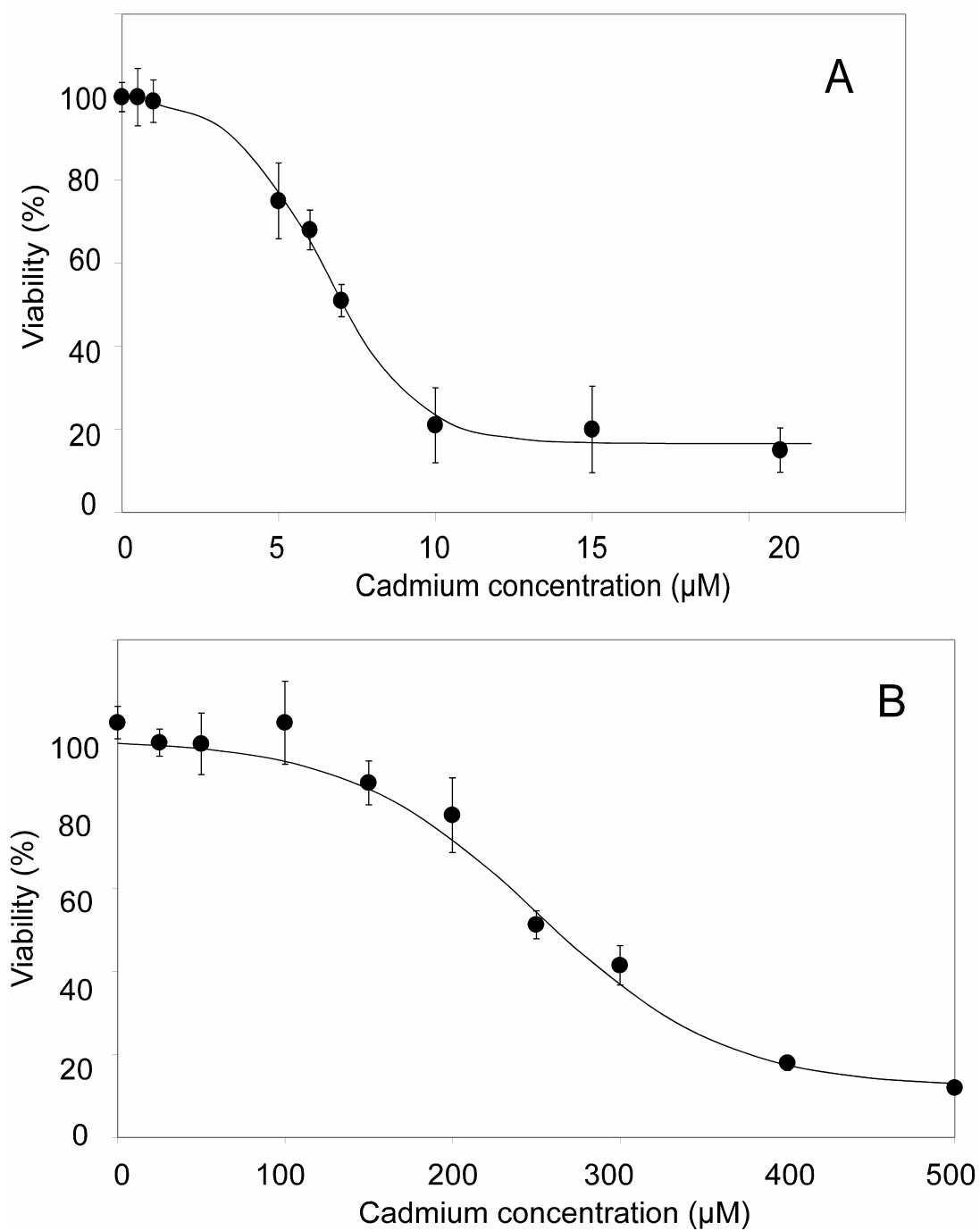
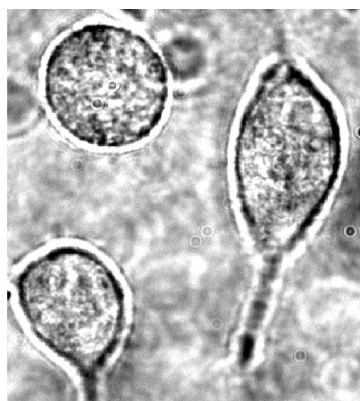
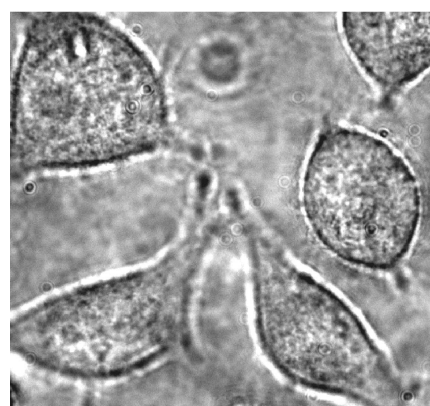
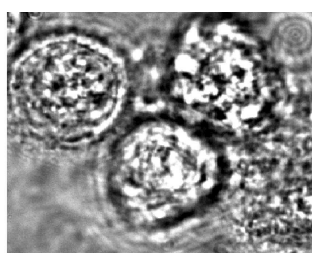
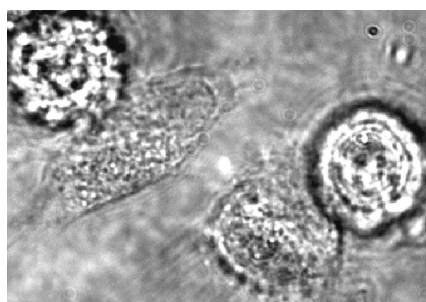


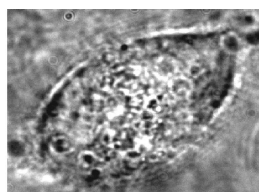
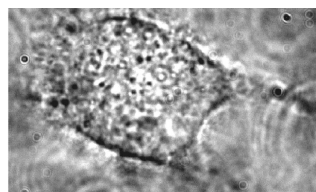
Figure 1



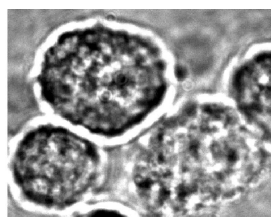
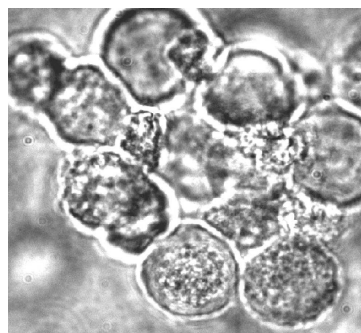
HeLa control



HeLa 7 μ M Cd



HZR control



HZR 250 μ M Cd

Figure 2

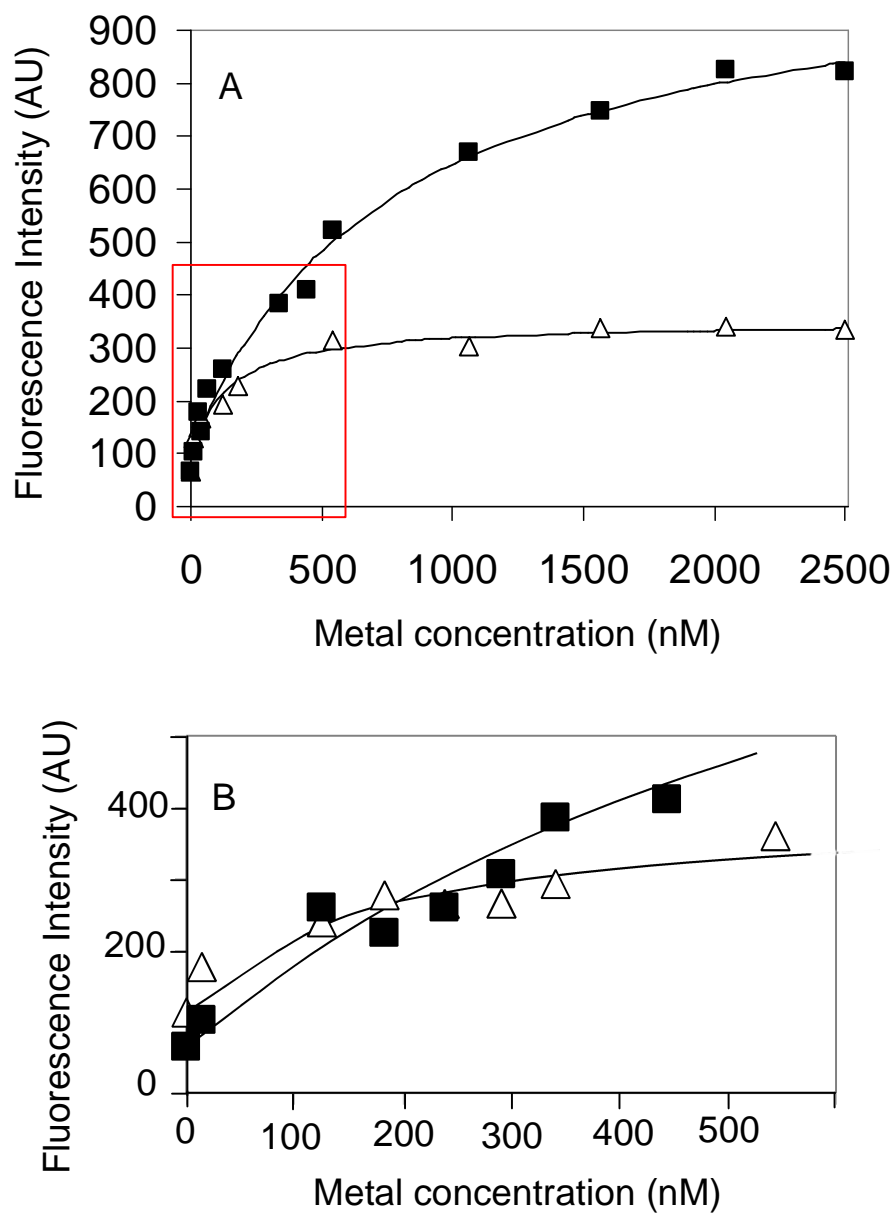


Figure 3

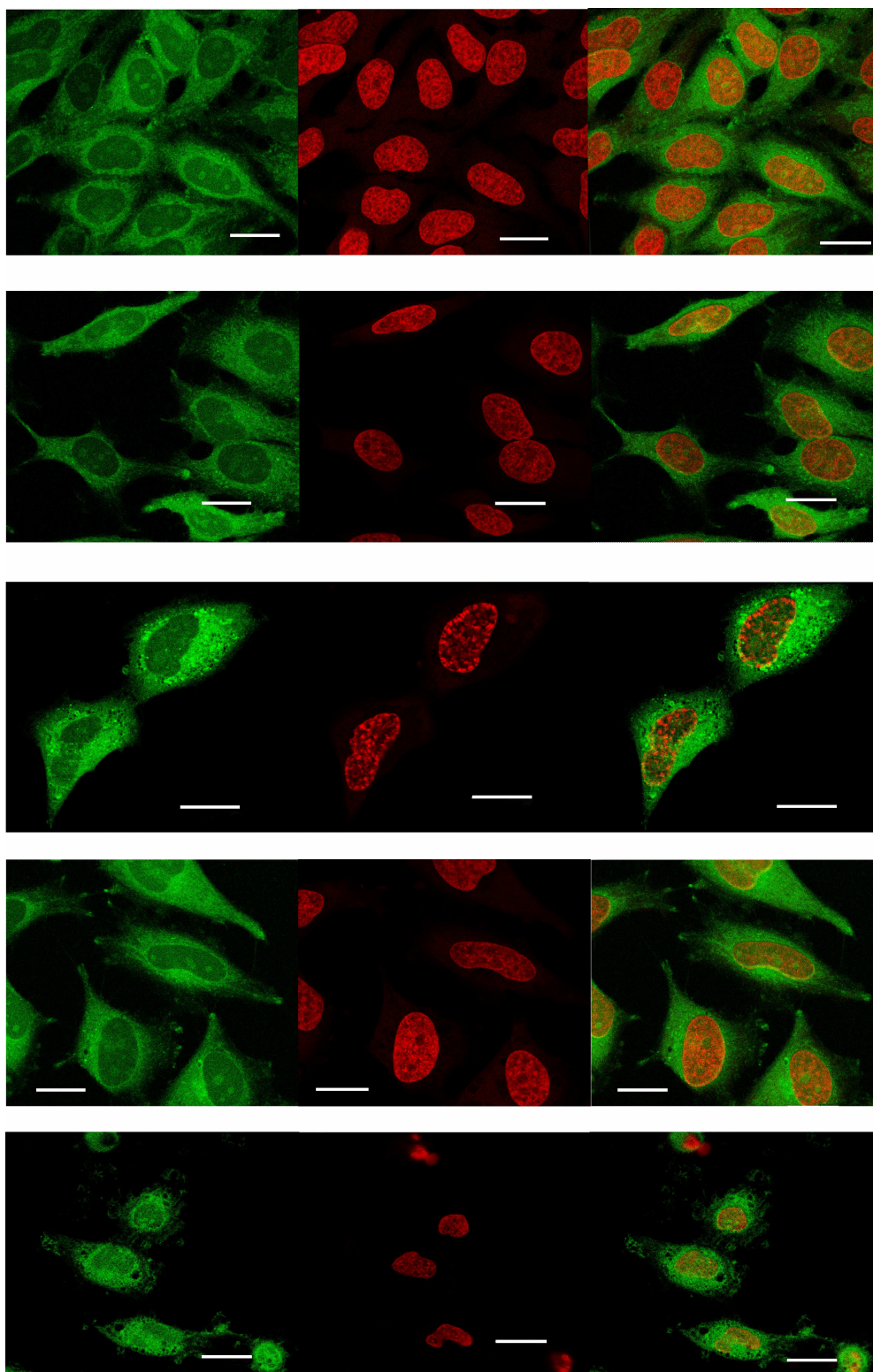


Figure 4

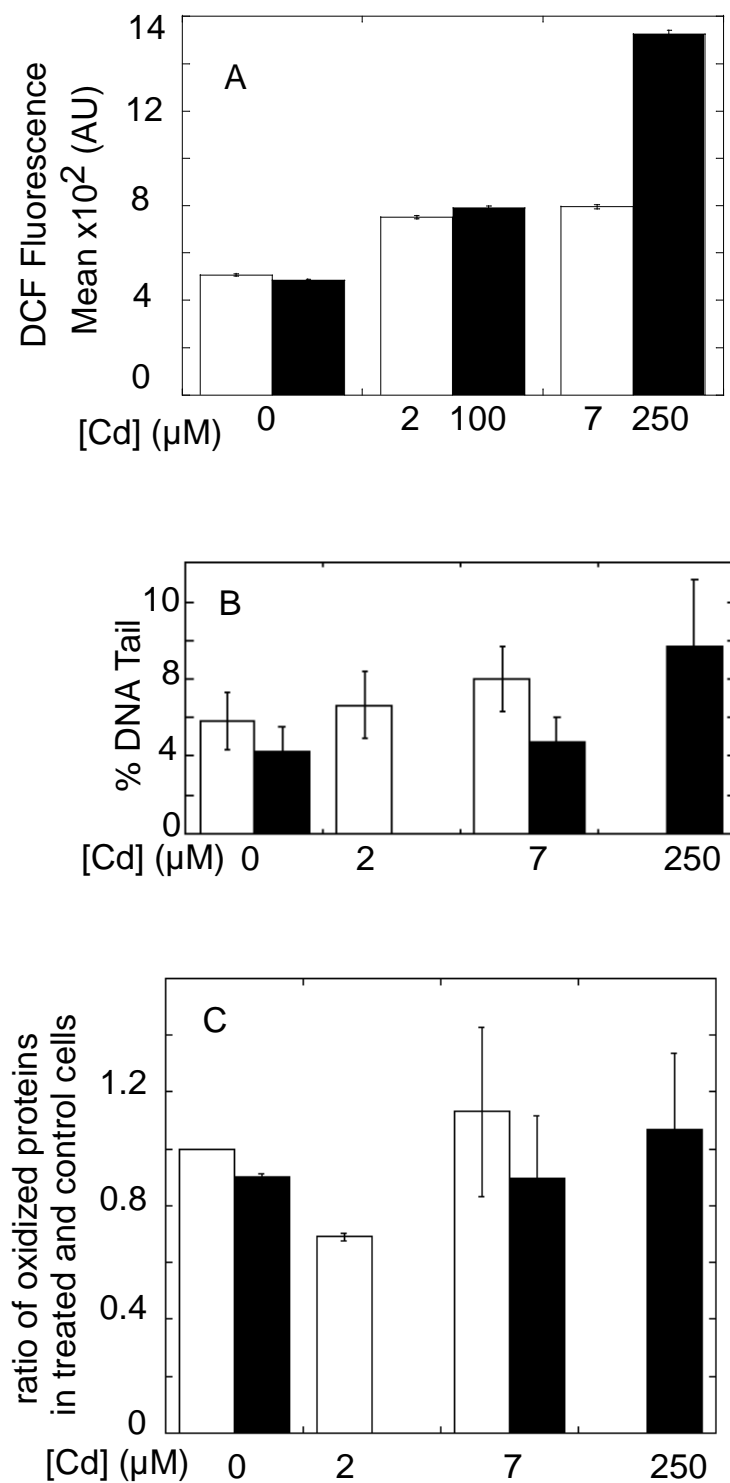


Figure 5

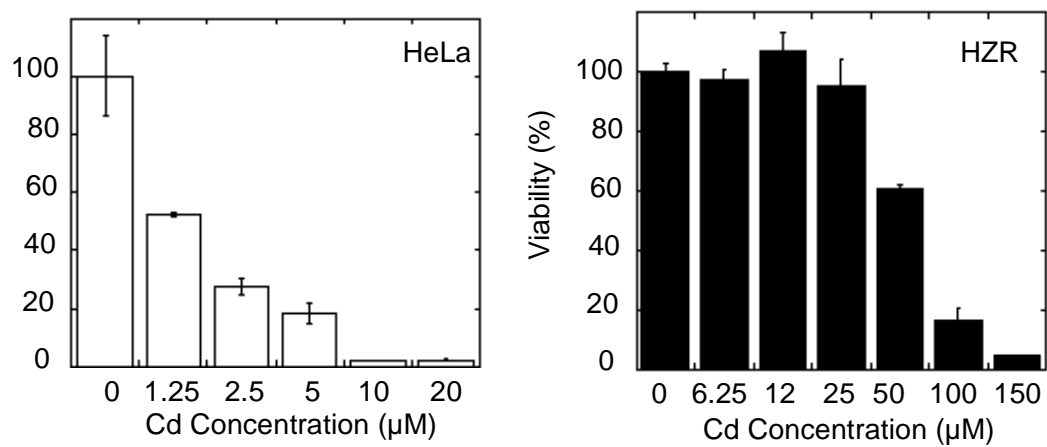


Figure 6

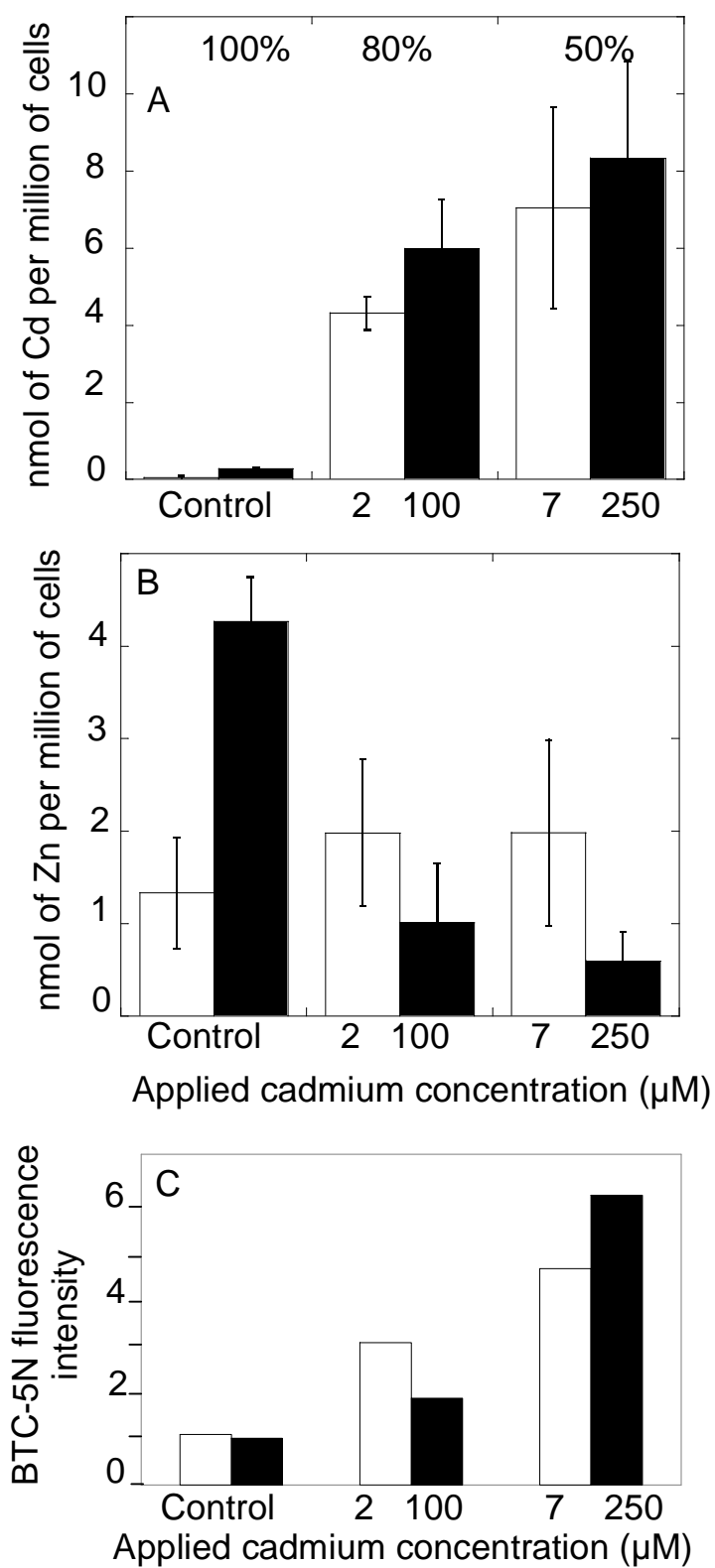


Figure 7

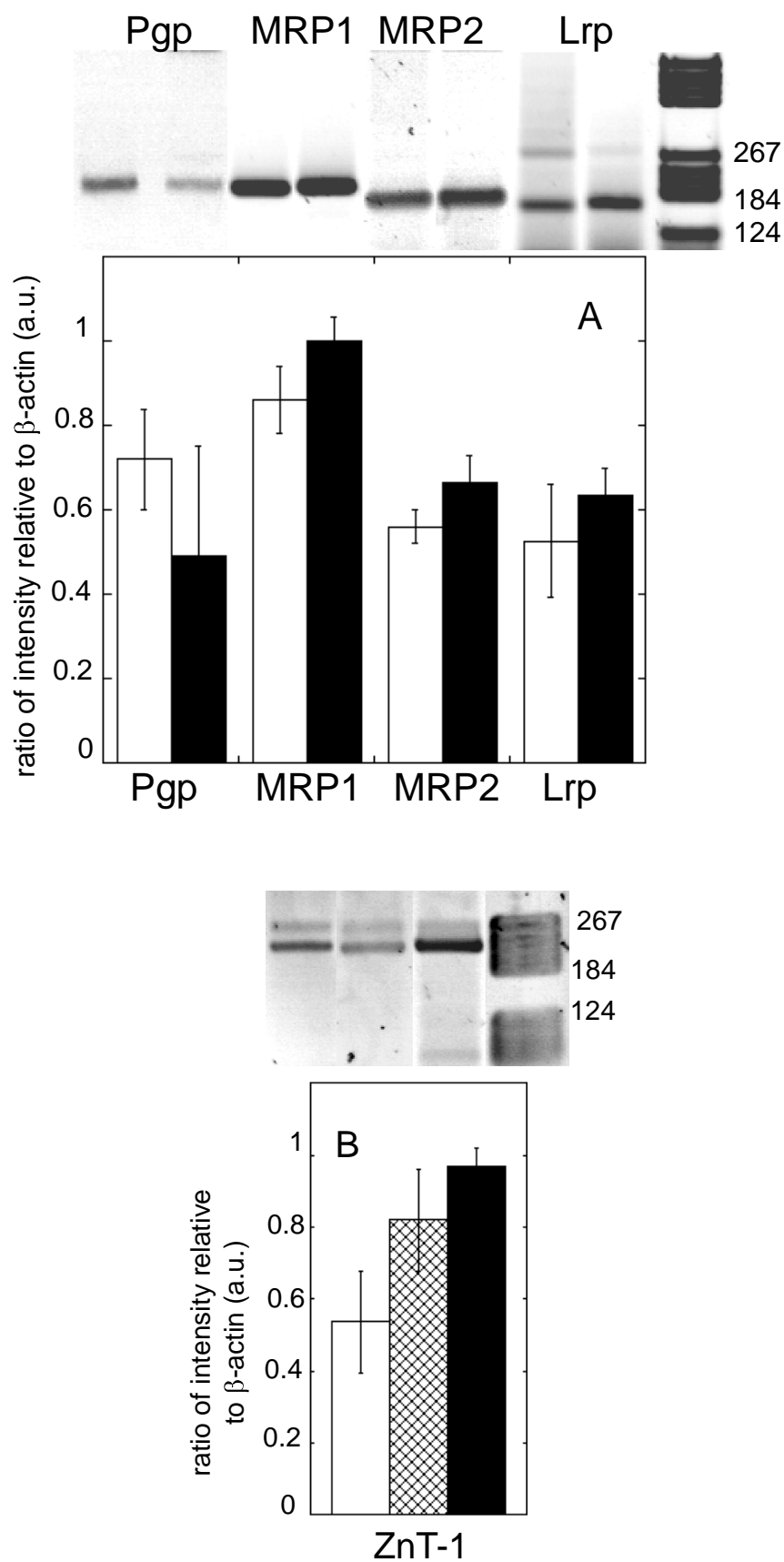


Figure 8

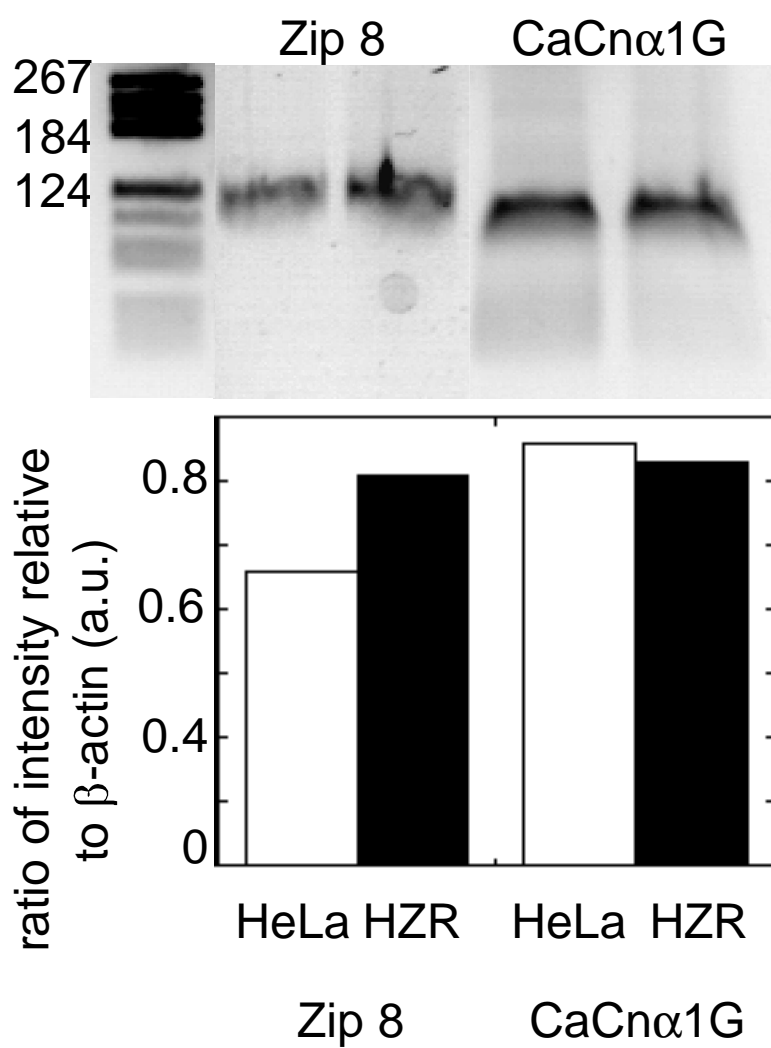


Figure 9

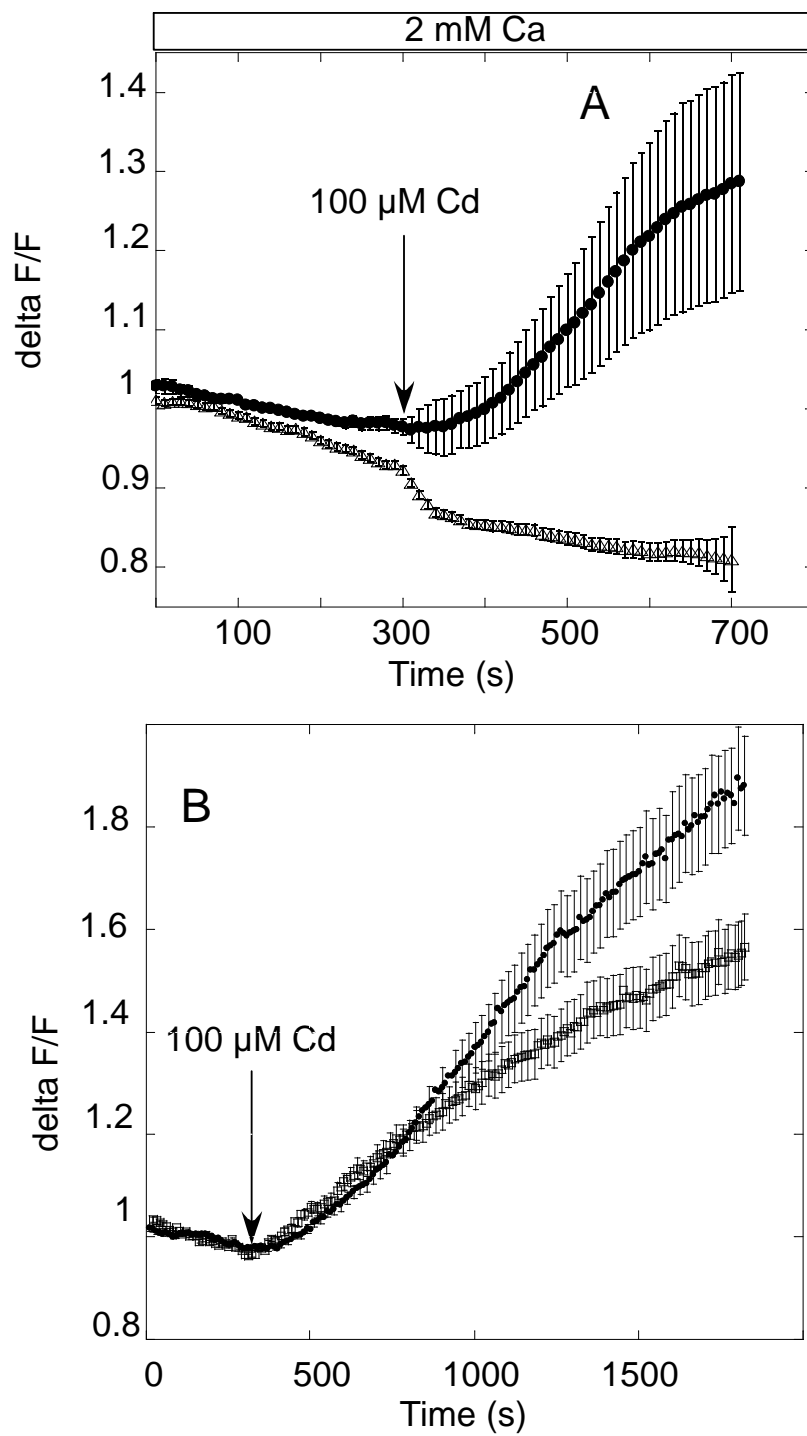


Figure 10

I-5. Résumé de l'article

I-5.1 Effets du cadmium dans les deux lignées cellulaires HeLa et HZR

Les études de cytotoxicité vis-à-vis du cadmium ont été réalisées sur vingt-quatre heures et ont permis de mettre en évidence la résistance remarquable des cellules HZR ($CL_{50}=250\text{ }\mu\text{M}$) en comparaison des cellules HeLa ($CL_{50}=7\text{ }\mu\text{M}$).

Malgré cette différence importante de résistance vis-à-vis du cadmium, de nombreuses conséquences suite à l'exposition de ce toxique sont similaires entre les deux lignées. Les similitudes et différences de l'effet du cadmium sur les lignées cellulaires HeLa et HZR précédemment relatées dans l'article 1 sont résumées dans le tableau ci-dessous :

Similitudes	Différences
<ul style="list-style-type: none">• La présence de Cd induit un changement morphologique des cellules.• Le glutathion joue un rôle protecteur vis-à-vis du Cd.• Localisation du Cd identique : distribution vésiculaire du Cd avec probablement une désorganisation du réticulum endoplasmique ou de l'appareil de Golgi. La distribution est également hétérogène entre le Cd et le Zn.• Le Cd induit l'apparition d'espèces réactives de l'oxygène mais cependant aucune oxydation masive de l'ADN ou du protéome sur les cellules adhérentes.	<ul style="list-style-type: none">• Résistance distincte vis-à-vis du zinc (CL_{50} deux fois plus importante pour les cellules HZR que les HeLa).• Résistance remarquable des cellules HZR vis-à-vis du cadmium (CL_{50} environ trente fois plus importante des cellules HZR par rapport aux cellules HeLa).• Le type de mort cellulaire pour des concentrations de Cd engendrant 50 % de mortalité est préférentiellement la nécrose pour les cellules HeLa, contrairement aux cellules HZR pour lesquelles l'apoptose et la nécrose sont en quantités équivalentes.• La concentration de glutathion ainsi que sa synthèse sont plus importantes dans les cellules HZR que dans les cellules HeLa.• Les cellules HZR supportent une concentration de Cd 20 fois plus importante que les HeLa en évitant l'accumulation de Cd intracellulaire.

Des similitudes présentées ci-dessus en découlent :

- 1/ Que le cadmium intracellulaire est pris en charge de manière équivalente dans les deux types cellulaires,
- 2/ Que les deux types cellulaires possèdent la même sensibilité pour des concentrations intracellulaires de cadmium similaires bien que les concentrations de cadmium appliquées dans le milieu de culture soient environ 20 fois supérieures dans le cas des cellules HZR,
- 3/ Que la synthèse de GSH plus importante dans les cellules HZR que dans les cellules HeLa n'explique pas la résistance remarquable des cellules HZR vis-à-vis du cadmium.

I-5.2 Rôle du zinc dans la résistance vis-à-vis du cadmium

Les cellules HZR supportent de fortes concentrations de zinc dans le milieu de culture et ce de manière permanente contrairement à la résistance vis-à-vis du cadmium qui n'est que transitoire. En effet, la viabilité des cellules HZR diminue fortement au bout du deuxième jour d'incubation avec 100 μ M de cadmium, ce qui est corrélé par une forte augmentation des dommages à l'ADN après 48 heures d'exposition (Résultats complémentaires I-6.1). Cependant le simple effet de pré-exposition vis-à-vis du zinc n'explique pas directement la résistance développée vis-à-vis du cadmium, dès lors que les cellules HeLa incubées durant une semaine en présence de zinc ont une viabilité vis-à-vis du cadmium légèrement supérieure que celle des cellules HeLa mais sans toutefois être aussi importante que celle des cellules HZR. Réciproquement, les cellules HZR perdent leur résistance vis-à-vis des deux métaux, le zinc et le cadmium, lorsqu'elles ne sont plus acclimatées en zinc. Ceci démontre le caractère réversible du phénotype de ces cellules, et donc du mécanisme qui l'induit. On pourrait se poser la question du rôle des métallothionéines qui sont sur-exprimées chez les cellules HZR et dont la concentration diminue, tout comme la concentration en zinc intracellulaire, chez les cellules HZR maintenues sans zinc pendant une semaine. L'activation du promoteur des métallothionéines I/II n'est pas plus forte pour ces dernières que pour des cellules HeLa exposées à 100 μ M de zinc pendant 24 heures (Chimienti et al., 2001). De plus, la synthèse des métallothionéines induite par incubation des cellules HeLa en présence de zinc pendant une semaine ne suffit pas à permettre une augmentation importante de la viabilité suite à un stress cadmium comme cela avait été proposé (Szuster-Ciesielska et al., 2000). De plus, la cinétique de perte du zinc intracellulaire (dosage intracellulaire de zinc), lorsque le zinc est

enlevé du milieu de culture pendant 24 heures au cours du stress cadmium, est plus rapide que la perte de résistance au cadmium.

Ainsi, la résistance des cellules HZR vis-à-vis du zinc est donc un élément important à prendre en compte dans la résistance vis-à-vis du cadmium, mais le mécanisme envisageable de protection vis-à-vis du cadmium procuré par la forte concentration de zinc accumulée par les cellules HZR n'explique pas l'ensemble des propriétés observées.

I-5.3 Informations obtenues sur l'origine de la résistance des cellules HZR vis-à-vis du cadmium

En effet, la cause majeure de la résistance des cellules HZR lors d'un stress cadmium est la limitation de l'entrée de cadmium dans ces cellules. Les expériences d'imagerie avec le Fluo-4 réalisées sur une échelle de temps plus courte que les mesures de viabilité nous ont permis de mettre en évidence une entrée de cadmium dans les cellules HeLa contrairement aux cellules HZR. L'entrée de cadmium est indépendante de la concentration extracellulaire de calcium ainsi que des stocks calciques internes. Quelques candidats décrits comme impliqués dans l'entrée de cadmium dans d'autres cellules ont été testé sans que nous obtenions la preuve de leur rôle dans le cas présent. Il semble donc qu'une voie inédite permettant l'entrée du cadmium dans les cellules HeLa soit inactivée dans les cellules HZR.

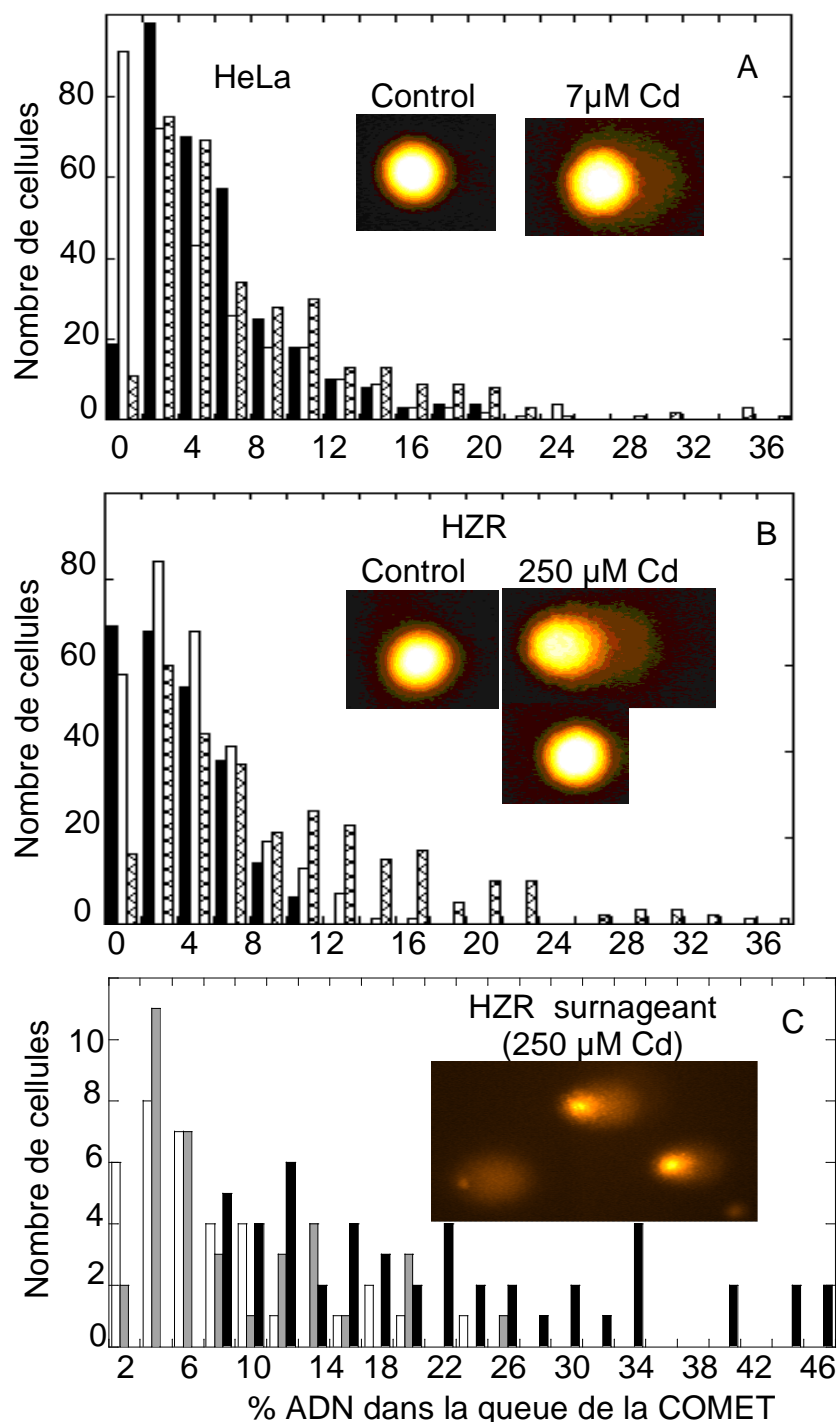


Figure I-1: Répartition du nombre de cellules en fonction du pourcentage d'ADN présent dans la queue de la comète pour les cellules HeLa (A) témoin (noir), traitées pendant 24h avec 2 μM (blanc) et 7 μM de Cd (hachurée). (B) Cellules HZR maintenues dans 200 μM de zinc (noir), traitées pendant 24h avec 100 μM (blanc) et 250 μM de Cd (hachurée). (C) Cellules HZR issues du surnageant des cellules maintenues dans 200 μM de zinc (noir), stressées avec 100 μM de Cd (blanc) ou 250 μM de Cd (gris). Les clichés photographiques correspondent aux comètes visualisées pour les cellules témoin ainsi que lors des plus forts traitements de cadmium. Pour les cellules issues du surnageant, le cliché témoigne de cassures importantes de l'ADN dans les cellules HZR après une exposition de 250 μM cadmium pendant 24 heures.

I-6. Résultats complémentaires

I-6.1 Mort cellulaire et dommages à l'ADN

Comme il a été exposé dans l'article, les graphiques sur lesquels figurent le nombre de cellules observées en fonction du pourcentage d'ADN dans la queue de la comète montrent pour les cellules HZR une distribution hétérogène des dommages à l'ADN contrairement aux cellules HeLa (Figure I-1A et B). La proportion des cellules HZR avec un pourcentage d'ADN dans la queue supérieur à 10%, augmente de 9.6% pour les cellules maintenues dans 200 μ M de zinc à 40% pour les cellules exposées à 250 μ M cadmium pendant 24 heures. Dans le cas des cellules HeLa ce pourcentage évolue de 15% pour les cellules contrôles, à 30% suite à l'exposition de 7 μ M de cadmium pendant 24 heures.

La faible proportion d'ADN dans la queue est en partie expliquée par le fait que cette méthode a été appliquée sur des cellules adhérentes afin de déterminer si les cassures de l'ADN étaient un évènement précoce dans l'induction de la mort cellulaire. Cependant, la méthode COMET a également été appliquée sur un petit nombre de cellules HZR du surnageant (entre 35 et 50). Le pourcentage d'ADN dans la queue est bien plus important que dans le cas des cellules adhérentes suite à une exposition à 250 μ M de cadmium (Figure I-1C). Pour les cellules HZR issues du surnageant, la proportion avec un pourcentage d'ADN dans la queue supérieur à 10% est de 17% dans le cas des cellules maintenues dans 200 μ M de zinc, et augmente à 33% puis 81% pour les cellules exposées à 7 et 250 μ M cadmium pendant 24 heures respectivement (Figure I-1C). Les cellules HZR issues du surnageant et traitées avec du cadmium ont un pourcentage d'ADN dans la queue qui est bien plus important que celui des cellules adhérentes. Cela est en relation avec la proportion de cellules HZR qui entrent en apoptose pour des concentrations de 250 μ M de cadmium et dont la majorité est déjà dans le surnageant (Rello et al., 2005). En effet, les cellules entrant en apoptose deviennent rondes et plus petites avec toutefois une intégrité de la membrane plasmique (Figure I-2, détection de l'acridine orange). Ainsi le noyau des cellules apoptotiques se colore en présence d'un colorant vital comme l'acridine orange mais pas en présence du bromure d'éthidium qui ne pénètre que si la membrane plasmique est endommagée (Figure I-2 détection du bromure d'éthidium). Par observation en microscopie de fluorescence du marquage au colorant vital, des corps apoptotiques sont nettement visibles et témoignent de la condensation et fragmentation de la chromatine (Figure I-2 détection de

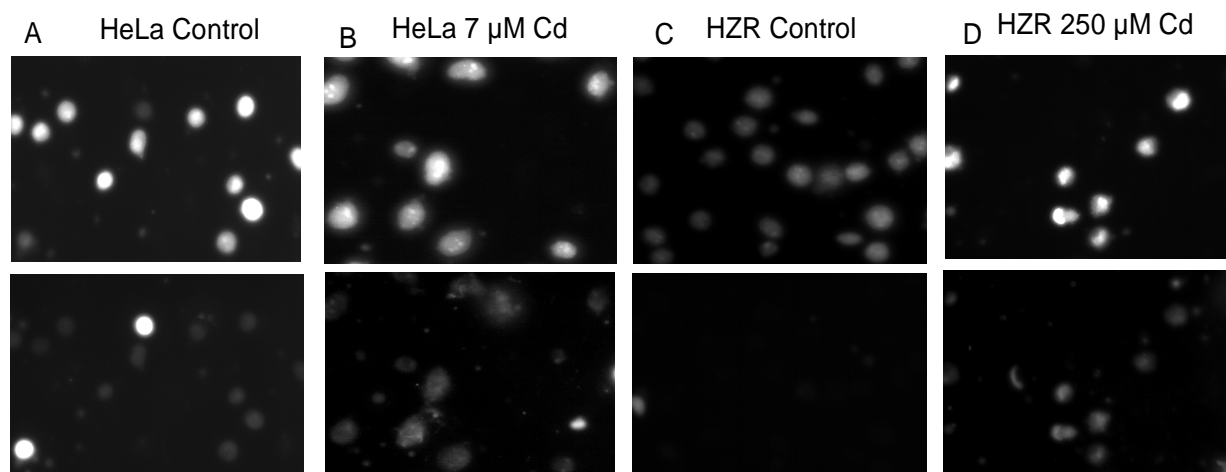


Figure I-2: Détermination du type de mort privilégié dans les deux types cellulaires suite à un stress cadmium. Les cellules HeLa contrôle (A) ont été traitées avec 7 μM d'acétate de cadmium pendant 24 heures (B) et les cellules HZR maintenues dans 200 μM de zinc (C) ont été traitées avec 250 μM d'acétate de cadmium pendant 24 heures (D). Les cellules ont été marquées avec du bromure d'éthidium et de l'acridine orange puis photographiées sous microscope à fluorescence avec les filtres correspondant à $\text{Ex}= 445 \pm 30$ et $\text{Em}= 610 \pm 70$ ou $\text{Ex}= 480 \pm 40$ nm et $\text{Em}= 530 \pm 30$. Les cellules vivantes et apoptotiques sont marquées avec **l'acridine orange (panneau du haut)** et les cellules apoptotiques possèdent un ADN condensé et fragmenté. Les cellules nécrotiques sont marquées au **bromure d'éthidium (panneau du bas)**. Les cellules marquées avec les deux colorants sont considérées comme des cellules en apoptose tardive.

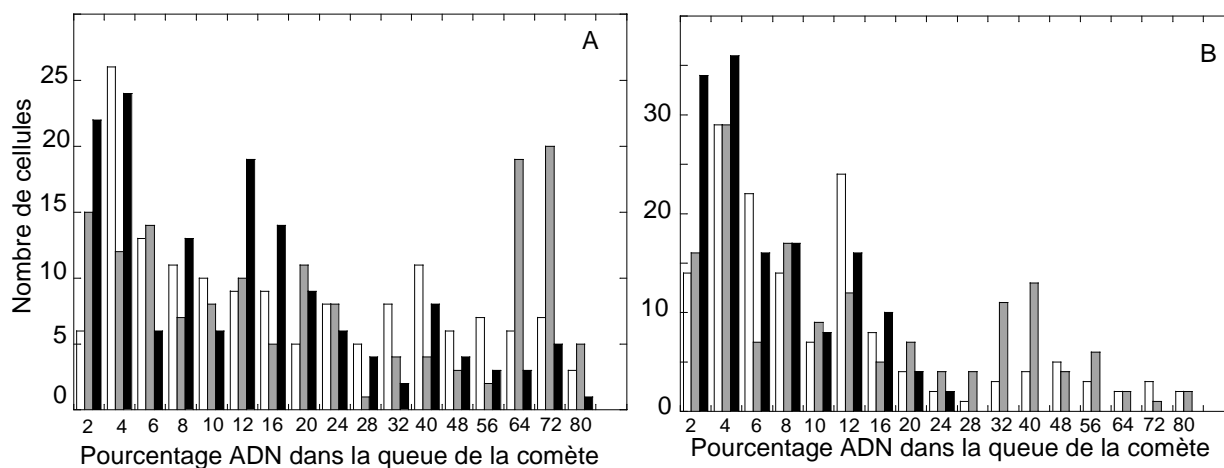


Figure I-3: L'histogramme représente le nombre de cellules ayant un pourcentage donné d'ADN présent dans la queue de la comète. (A) Répartition du pourcentage d'ADN présent dans la queue de la comète pour les cellules HZR adhérentes et flottantes, suite à un stress de 100 μM de cadmium pendant 24h (noir), 48h (blanc) ou 60h (gris). (B) Même légende que précédemment pour des cellules HZR adhérentes et flottantes, suite à un stress de 100 μM zinc.

l'acridine orange). Le fait que les cellules HZR en apoptose se trouvent majoritairement dans le surnageant est expliqué par la perte des connexions membranaires des cellules avec leurs voisines suivie du détachement du support (Rello et al., 2005). Les cellules nécrotiques présentent des déformations de la membrane plasmique qui entraînent la rupture de la membrane plasmique tandis que le corps cellulaire reste sur le support (résidus adhérents). La forte résistance vis-à-vis du cadmium des cellules HZR pendant 24 heures nous a incité à étudier cette résistance sur des temps d'exposition plus longs. Ainsi, les cellules HZR ont été exposées à 100 μM de cadmium, qui est une concentration sub-létale pendant 24 heures, puis récoltées à divers temps afin de mesurer la viabilité par le bleu de trypan. Au bout de 48 heures d'exposition, 43 % des cellules sont encore viables, au bout de 60 heures seules 30 % le sont et à 72 heures plus aucune cellule n'est viable. La résistance des cellules HZR vis-à-vis du cadmium est donc transitoire au contraire de celle développée pour le zinc.

Toujours dans le souci de discerner en quoi la résistance développée par les cellules HZR vis-à-vis du cadmium diffère de celle du zinc, des mesures de dommages à l'ADN ont été effectuées par la méthode des comètes. Les cellules HZR ont été incubées dans 100 μM de zinc ou de cadmium pendant 24, 48 et 60 heures avant d'être récoltées. Les résultats obtenus sont présentés sur la figure I-3 et représentent le nombre de cellules adhérentes et du surnageant en fonction du pourcentage d'ADN dans la queue de la comète. En ce qui concerne les dommages à l'ADN suite à une exposition au cadmium des cellules pendant 24 et 48 heures, le pourcentage de dommages supérieurs à 12% mesurés dans la queue de la comète augmente de 56% à 62% (Figure I-3A). Ces valeurs sont élevées et montrent une fragmentation importante de l'ADN. Après 60 heures d'exposition au cadmium, ce pourcentage diminue à 52% ce qui semble significatif d'un stade très avancé de mort cellulaire avec perte du noyau dans le milieu cellulaire suite à une perméabilisation de la membrane plasmique.

Dans le cas des cellules exposées à 100 μM de zinc pendant 24 ou 48 heures, il est étonnant de remarquer que les pourcentages de dommages supérieurs à 12% mesurés dans la queue de la comète sont de 41.5% et 48% respectivement. Ce pourcentage est assez élevé mais diminue ensuite à 22.3% au bout de 60 heures d'exposition (Figure I-3B) ; aucunes variations sensibles de ces valeurs ne sont attendues puisque les HZR sont maintenues en routine avec une concentration de zinc supérieure. Cependant les résultats présentés ne sont la représentation que d'une seule expérience, cela nous informe sur la sensibilité de l'ADN des cellules HZR mais en aucun cas ne nous permet d'en déduire un résultat net. Contrairement aux cellules exposées au cadmium, l'exposition au zinc n'entraîne aucune diminution

remarquable de la viabilité puisqu'elle reste stable à environ 90% pour les durées d'exposition de 24, 48 ou 60 heures.

I-6. 2 Etude des réponses calciques des deux lignées cellulaires HeLa et HZR

Toute cette étude a été réalisée par des méthodes d'imagerie permettant de visualiser les flux ioniques grâce à l'utilisation de la sonde Fluo-4 dont la fluorescence augmente par chélation du calcium. Cependant, comme dans le cas de la plupart des chélateurs de métaux, le calcium n'est pas le seul cation dont la chélation entraîne une augmentation de la fluorescence (Figure I-4).

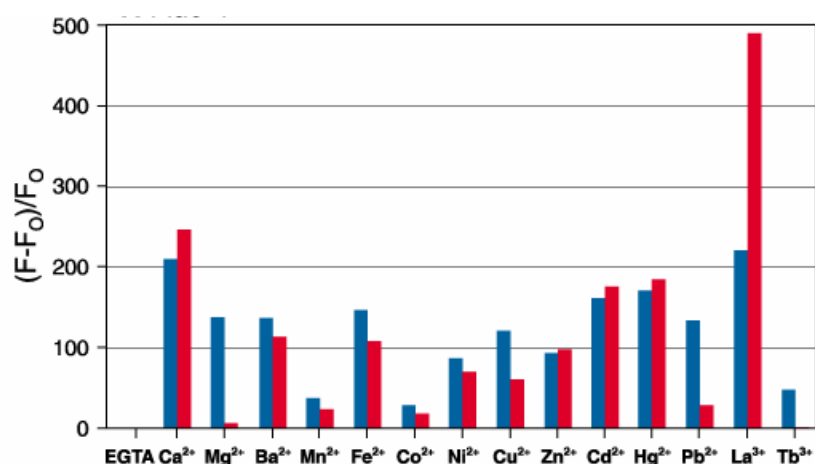


Figure I-4: Figure du Handbook de Molecular Probes (Invitrogen) représentant l'intensité relative de fluorescence $(F-F_0)/F_0$ en fonction du métal chélaté avec le Fluo-4 (Molecular Probes). F est l'intensité de fluorescence maximale dans la solution contenant 10 mM EGTA + 10 μM TPEN, 1 μM ion (barres bleues) et 100 μM ion (barres rouges). F_0 est l'intensité de fluorescence mesurée dans une solution 10 mM EGTA + 10 μM TPEN.

I-6. 2 a Mise en évidence de la présence de canaux capacitifs d'entrée du calcium.

Dans le but de mettre en évidence des différences existantes entre les cellules HeLa et les cellules HZR, nous nous sommes intéressés aux canaux calciques, dont certains ont été impliqués dans les flux de cadmium (voir introduction de ce chapitre). Cependant la diversité de canaux existants nous a orienté vers l'étude de seulement certains décrits dans les cellules épithéliales HeLa (Peppiatt et al., 2004). Nous avons donc exploré les réponses calciques dues aux canaux SOC (*Store Operated Calcium Channel*), dits « capacitifs ». L'entrée capacitive permet de remplir les stocks calciques internes par passage du métal à travers la membrane plasmique. En effet, la libération de calcium des stocks intracellulaires due à l'action de

l'inositol triphosphate $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ est suivie de l'ouverture de canaux calciques au niveau de la membrane plasmique. Plusieurs modèles ont été proposés afin d'expliquer les mécanismes d'ouverture des SOC suite à une diminution des stocks calciques du RE (Bolotina and Csutora, 2005; Putney et al., 2001). Deux acteurs ont récemment été mis en évidence: il s'agit d'une protéine, Stim1, détectant le calcium du RE et qui se redistribue afin d'approcher la membrane plasmique pour entrer en contact, direct ou indirect, avec une autre protéine, Orai, qui forme une sous-unité du canal SOC (Putney et al., 2001).

Comme expliqué ci-dessus, ces canaux ne s'ouvrent que suite à un appauvrissement des stocks internes du réticulum endoplasmique pour permettre l'entrée rétroactive de calcium dans la cellule et ainsi un retour à l'état d'équilibre. La libération des stocks internes du RE peut être induite par la thapsigargine qui est un inhibiteur irréversible de SERCA (*sarcoendoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase*) (Treiman et al., 1998). Ce transporteur permet l'entrée de calcium du cytosol dans le RE.

Avant le début des mesures de flux ioniques, les cellules sont perfusées pendant au moins sept minutes dans un milieu Tyrode sans calcium, jusqu'à la stabilisation du signal de fluorescence. En début d'expérience, la thapsigargine est appliquée sur les cellules perfusées dans un milieu sans calcium. Pour les cellules HZR l'application de thapsigargine est suivie par l'augmentation de la fluorescence significative de la libération des stocks de calcium ou de zinc, étant donné que l'augmentation de la fluorescence peut être due aux deux métaux, du RE, contrairement aux cellules HeLa (Figure I-5). L'application de calcium extracellulaire entraîne ensuite une augmentation de la fluorescence qui révèle l'entrée de calcium par les canaux capacitifs. Celle-ci est d'amplitude similaire pour les deux types cellulaires. L'application de thapsigargine entraîne une libération des stocks du RE très faible pour les cellules HeLa contrairement aux cellules HZR. Une possibilité est que le calcium libéré du RE est rapidement re-capté par un autre organe comme les mitochondries (Varadi et al., 2004).

Afin de tester cette hypothèse, nous avons appliqué du FCCP (carbonyl cyanide-4-trifluoromethoxyphenylhydrazone), qui est un découpleur de la fonction mitochondriale (phosphorylation oxydative), et de la thapsigargine sur un petit nombre de cellules. Ainsi, le calcium sortant des stocks du RE ne peut pas être recapté par les mitochondries, ce qui doit se traduire par une augmentation de fluorescence dans les cellules HeLa. Cependant ce n'est pas ce qui est observé : l'amplitude reste faible lors de l'application des drogues, donc, soit les

stocks calciques des cellules HeLa sont effectivement pauvres, soit le calcium est re-capté par un autre organelle. De plus, l'entrée capacitive, très bien visualisée précédemment en absence de FCCP, est très faible en présence du découpleur (Figure I-5). Une tentative d'explication est que les mitochondries pourraient jouer un rôle important dans l'activation des canaux SOC. Les procédures qui empêchent la formation d'un gradient local de calcium dans les mitochondries inhibent l'entrée capacitive (Malli et al., 2003). Cela expliquerait pourquoi l'entrée rétroactive de calcium par les SOC soit si faible suite à l'application de FCCP.

Afin de s'assurer que les cellules HZR possèdent des stocks calciques internes plus abondants que les cellules HeLa, de l'ionomycine a été appliquée sur les deux types cellulaires. Cela permet de perméabiliser les membranes et ainsi de libérer les stocks calciques de tous les compartiments cellulaires. Pour les cellules HeLa, l'application de 1 μ M d'ionomycine n'engendre pas de différences de fluorescence (Figure I-6). Par contre, dans le cas des cellules HZR, l'application de 1 μ M d'ionomycine provoque une augmentation de fluorescence de 15 % qui est transitoire (Figure I-6). La diminution de fluorescence qui suit correspond à l'efflux massif de calcium, ou d'un autre métal comme peut être le zinc, capable de former un complexe avec le Fluo-4 intracellulaire. Ces expériences montrent que les stocks internes des cellules HeLa sont très pauvres au contraire des cellules HZR.

I-6.2 b Mise en évidence de l'entrée de cadmium

Comme il a été présenté dans l'article 1, la fluorescence augmente de manière régulière suite à l'application de cadmium dans les cellules HeLa, et cela indépendamment de la concentration en calcium dans la solution Tyrode, contrairement aux cellules HZR. Cette observation d'intérêt peut être provoquée par une entrée dans le cytosol de cations chélatables par Fluo-4 induite par le cadmium, sans que la nature du cation responsable de l'augmentation de fluorescence soit connue. Afin de progresser sur cette question, la thapsigargine a été appliquée pour vider les stocks internes puis les cellules ont été perfusées avec une solution de Tyrode sans calcium, supplémentée avec du cadmium.

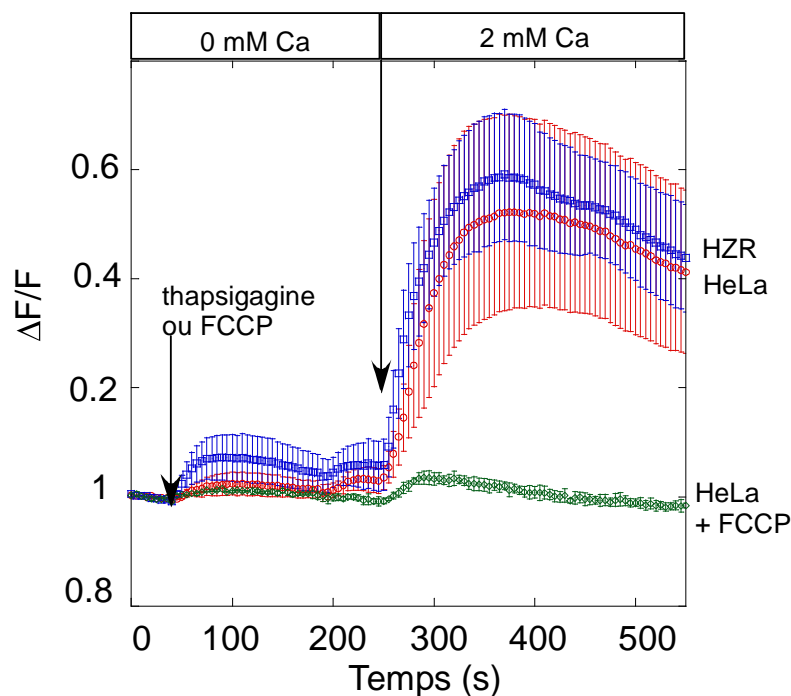


Figure I-5: Comparaison de l'entrée capacitive du calcium détecté par la sonde Fluo-4 dans les cellules HeLa (rouge n= 142 cellules) et HZR (bleu n=134 cellules). Les cellules HeLa ont également été soumises à une application de FCCP (vert n=22 cellules). Le graphique montre le changement de fluorescence relative en fonction du temps en réponse à une application de thapsigargine (2 μ M) ou de FCCP (1 μ M) puis de calcium extracellulaire.

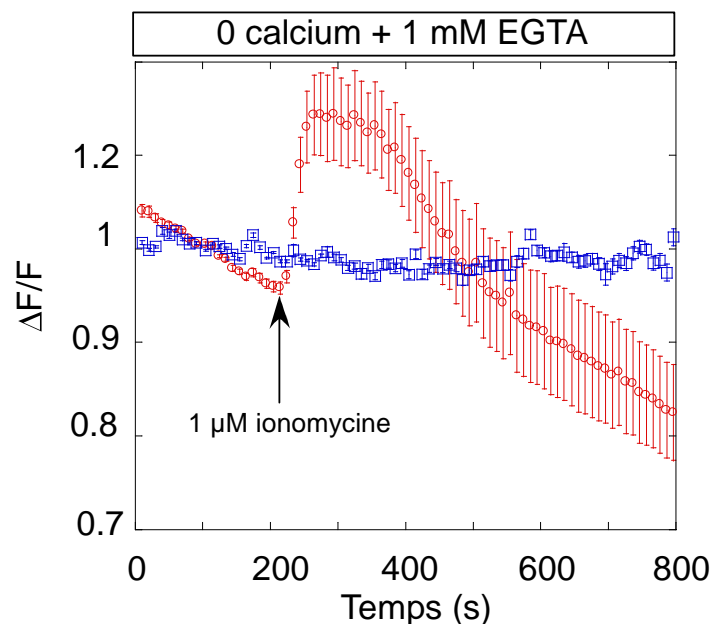


Figure I-6: Variations de fluorescence suite à l'application d'ionomycine sur les cellules HeLa (bleu n=37 cellules) et les cellules HZR (rouge n= 32 cellules).

Pour les cellules HeLa, l'augmentation de fluorescence correspondant à l'application de thapsigargine est très faible mais elle l'est encore plus pour les cellules HZR, contrairement à ce qui a été montré précédemment (Figure I-5). Cela est expliqué par le faible nombre de cellules HZR pour lesquelles les variations de fluorescence ont été enregistrées ainsi que des écarts importants entre les réponses de chaque cellule. L'ajout de cadmium induit, pour les cellules HeLa, une augmentation de fluorescence de $d(F/F_0)/dt=0,00039 \text{ s}^{-1}$, soit du même ordre que celle obtenue pour les cellules HZR dont le zinc a été enlevé pendant une semaine ($d(F/F_0)/dt=0,00029 \text{ s}^{-1}$) (Figure I-7). Pour les cellules HZR, la variation de fluorescence est de $(d(F/F_0)/dt= 8 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1})$, ce qui est bien inférieure à celle des cellules HeLa. Donc dans les cellules HeLa et HZR dont le zinc a été enlevé pendant une semaine, la fluorescence augmente suite à l'application de cadmium. Ces résultats nous indiquent, premièrement, qu'il s'agit bien d'une entrée de cadmium puisque c'est le seul cation réagissant avec le Fluo-4 présent dans l'expérience, cependant l'application de thapsigargine semble influencer sur les variations de fluorescence consécutives à l'application de cadmium car l'augmentation de fluorescence est plus faible que celle obtenue pour les cellules HeLa qui n'ont pas été incubées dans de la thapsigargine (Article 1, figure 10).

Afin de préciser ces résultats, nous avons effectué l'expérience décrite précédemment sur des cellules HZR dont le milieu de culture n'a pas été supplémenté en zinc pendant une semaine. Les cellules HZR accumulent du zinc, mais, lorsqu'elles ne sont pas supplémentées en zinc pendant une semaine, leur concentration intracellulaire de zinc diminue et devient équivalente à celle mesurée dans les cellules HeLa (Chimienti et al., 2001). De manière intéressante, la viabilité de ces cellules en présence de cadmium diminue également (Figure I-8).

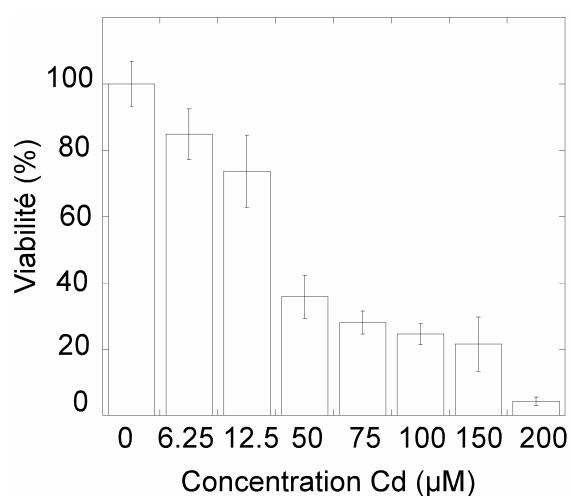


Figure I-8: Effet du cadmium sur la viabilité des cellules HZR maintenues dans un milieu sans zinc pendant une semaine. Ces cellules ont été traitées avec des concentrations croissantes de cadmium dans le milieu de culture pendant 24 heures. Les cellules viables ont été mesurées avec le test MTT. Les résultats sont reportés en fonction du pourcentage du nombre de cellules viables non exposées au cadmium. La déviation standard de chaque point est calculée à partir de mesures effectuées en quadruplet de deux expériences indépendantes.

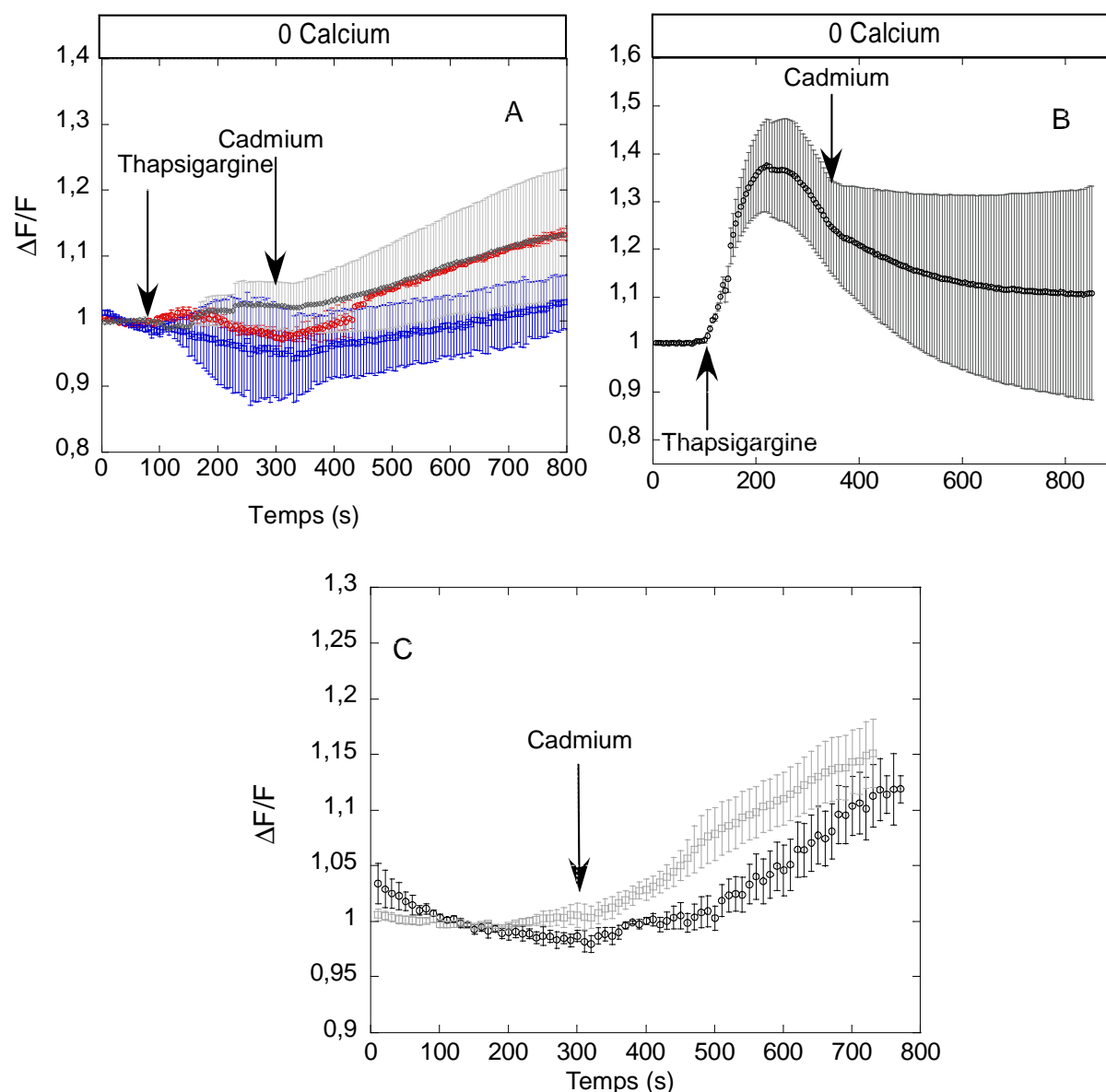


Figure I-7: (A) Flux ioniques détectées par le Fluo-4 suite à l'application de thapsigargine puis de cadmium dans les cellules HeLa (rouge, n=96 cellules), HZR (bleu, n= 37 cellules) et HZR maintenues dans un milieu sans zinc pendant une semaine (gris, n=50 cellules). (B) Expérience identique enregistrée sur des cellules HZR pré-incubées pendant une heure dans 3 μ M de TPEN (n=44 cellules). (C) L'augmentation de fluorescence est enregistrée en fonction du temps en réponse à l'application de 100 μ M de cadmium sur les cellules HZR maintenues dans un milieu sans zinc pendant une semaine avec (noir, n= 60 cellules) ou sans calcium extracellulaire (gris, n=72 cellules).

L'application de thapsigargine entraîne une augmentation de fluorescence ainsi que l'addition de cadmium consécutive (Figure I-7A). Ainsi, l'augmentation de fluorescence observée suite à l'application de thapsigargine ne semble pas être la conséquence d'une libération de zinc intracellulaire puisqu'il n'y en a pas plus dans les cellules HZR-7J que dans les cellules HeLa. Cette déduction est appuyée par le fait que la fluorescence augmente suite à l'application de thapsigargine sur les cellules HZR qui ont été pré-incubées dans la solution Tyrode pendant une heure en présence de 3 μM de TPEN, qui est un chélateur de zinc et qui peut éliminer le zinc facilement mobilisable pendant la pré-incubation (Figure I-7B).

Dans les cellules HZR dont le zinc a été enlevé du milieu de culture pendant une semaine, l'augmentation de fluorescence suite à l'application de cadmium est observée (Figure I-7C), alors qu'elle est absente pour les cellules HZR maintenues en 200 μM de zinc (Figure 10 article 1). Cette augmentation est indépendante de la concentration en calcium dans le milieu de perfusion, comme pour les cellules HeLa. Ces cellules HZR dont le milieu n'est pas supplémenté en zinc est un intermédiaire phénotypique entre les cellules HeLa et les cellules HZR par rapport aux propriétés étudiées ici, comme précédemment décrit pour la résistance vis-à-vis du zinc et de l'application de peroxyde d'hydrogène (Chimienti et al., 2001).

I-6.2 c Tests d'inhibition de l'entrée de cadmium.

Divers bloqueurs de canaux calciques ont été utilisés afin de mettre en évidence une voie d'entrée privilégiée du cadmium dans les cellules HeLa. Les cellules ont été perfusées dans une solution de Tyrode en présence ou non de calcium extracellulaire. Rapidement après l'addition de 100 μM de cadmium ainsi que de 10 μM de nifédipine, la fluorescence augmente de manière régulière (Figure I-9A). L'application de nifédipine, qui est un inhibiteur des canaux sensibles au potentiel de classe L, n'a manifestement aucun effet inhibiteur sur l'entrée de cadmium dans les cellules HeLa.

Deux acides gras possédant une insaturation et de configuration *cis* ou *trans* ont été testés. Les acides gras dont la double liaison est de configuration *cis* et proches du carboxyle favorisent l'inhibition des canaux calciques de type T (Chemin et al., 2007). Suite à l'incubation des cellules HeLa, en absence de calcium, pendant 2 à 3 minutes dans 20 μM de *cis* ou *trans* acide octadécèn(6)oïque (AO), l'application de cadmium engendre une augmentation de fluorescence similaire à celle en absence d'acides gras (Figure I- 9B). Ce type de canal ne semble donc pas impliqué dans l'entrée de cadmium.

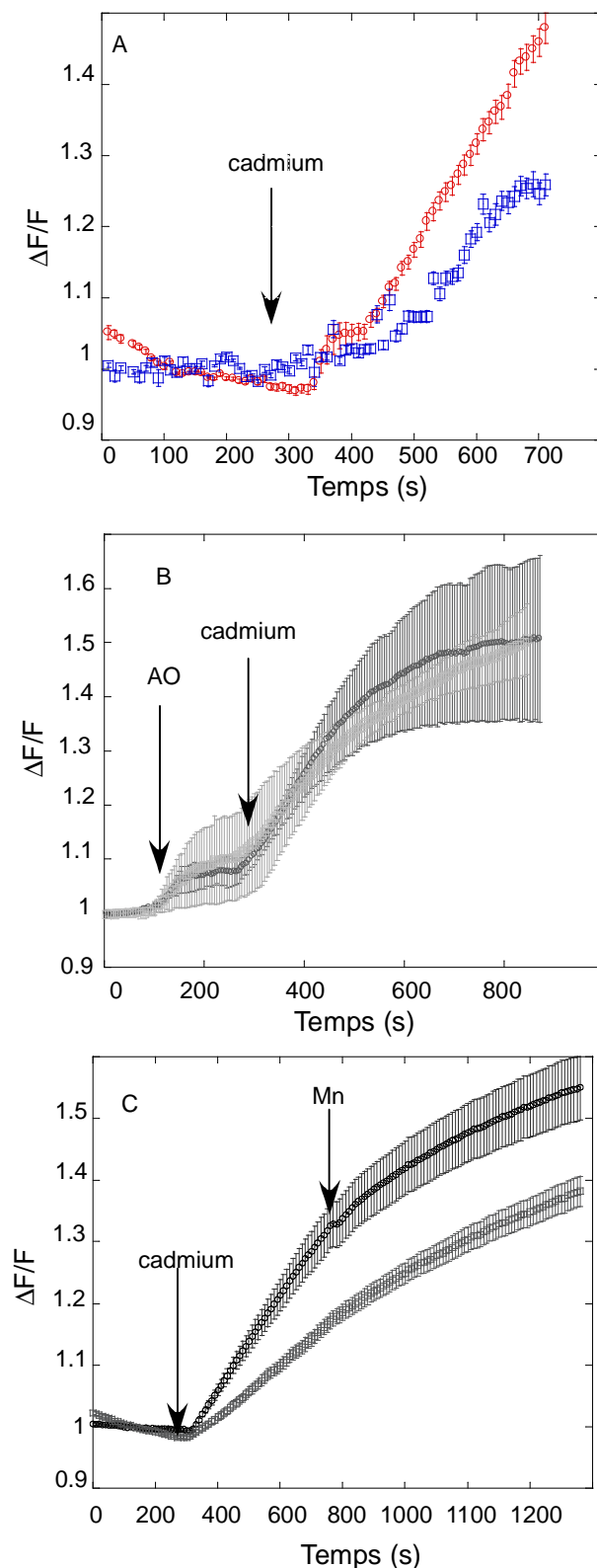


Figure I-9 : (A) Effet de 10 μM de nifédipine sur des cellules HeLa perfusées avec calcium (bleu, $n=23$ cellules) ou sans calcium (rouge, $n=47$ cellules) ainsi qu'en présence de cadmium. (B) Effet de 10 μM de cis (noir, $n=37$ cellules) ou trans acide octadécén(6)oïque (gris, $n=34$ cellules) dans une solution Tyrode sans calcium. (C) Effet d'un équivalent de manganèse dans la solution Tyrode sans calcium (noir, $n=45$ cellules) ou de deux équivalents (gris, $n=45$ cellules) après application de 100 μM cadmium.

Le manganèse a été décrit comme un compétiteur de cadmium, réduisant ainsi son entrée (Himeno et al., 2002). Nous avons donc utilisé le même type d'expérience que précédemment, en ajoutant dans la solution de perfusion diverses concentrations de manganèse. L'application de manganèse réduit la fluorescence. Cependant cette diminution semble indépendante de la concentration en manganèse (Figure I- 9C) car les pentes des tangentes correspondant à l'application de manganèse sont similaires dans les deux cas ($((d(F/F_0)dt)_{100}=0.00029\text{ s}^{-1}$; $(d(F/F_0)dt)_{200}=0.00027\text{ s}^{-1}$). Il serait souhaitable de confirmer ce résultat par une autre méthode car la chélation du manganèse par la sonde Fluo-4 est susceptible de conduire à une diminution de la fluorescence. Cependant la même contribution de la concentration de manganèse pour deux valeurs variant du simple au double suggère que l'entrée de manganèse est saturante dans cette gamme, mais elle n'abroge pas celle de cadmium.

I-7 Mécanismes de toxicité du cadmium

Comme il a été décrit dans l'article 1, le stress cadmium effectué sur les deux lignées cellulaires, engendre une forte diminution du niveau de glutathion, notamment pour les cellules HZR en présence de concentrations de cadmium induisant 50% de mortalité. De plus celles-ci semblent être plus sujettes à l'apparition des espèces réactives de l'oxygène en présence de cadmium, comparativement aux cellules HeLa. Les cellules HZR sont également beaucoup plus sensibles que les cellules HeLa à un stress au peroxyde d'hydrogène (Chimienti et al., 2001). Un mécanisme potentiel proposé pour expliquer l'augmentation d'espèces réactives de l'oxygène est la perturbation de l'homéostasie d'un métal redox actif. C'est donc cette étude qui est abordée au chapitre suivant.

Chapitre 2 : Etude de l'effet du cadmium sur l'homéostasie du fer chez les mammifères.

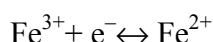
Chapitre 2 : Etude de l'effet du cadmium sur l'homéostasie du fer chez les mammifères.

Afin de mieux comprendre comment le cadmium peut interférer avec l'homéostasie d'un métal redox actif comme le fer, il s'avère nécessaire de présenter comment les mammifères régulent la concentration de ce métal de transition afin de limiter sa toxicité tout en assurant son approvisionnement pour les systèmes biologiques qui l'utilisent.

II-1. Régulation de l'homéostasie du fer chez les mammifères.

II-1.1 Le fer : un métal au rôle dual.

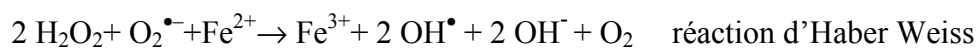
Le fer est un élément des plus abondants, représentant près de 5% de la croûte terrestre sous différentes formes minérales. C'est un métal de transition dont la couche 3d n'est que partiellement remplie, ce qui confère à ses ions des propriétés de donneur ou d'accepteur d'électrons. Dans les milieux biologiques, le fer se présente principalement sous deux formes ioniques : l'état ferreux Fe^{2+} ($3d^6$) et l'état ferrique Fe^{3+} ($3d^5$). Le fer (III) est le plus souvent accepteur d'électrons alors que le fer (II) est donneur d'électrons:



L'interconversion de ces états est à l'origine de réactions de réduction ou d'oxydation, essentielles en biologie.

Chez l'Homme adulte, la quantité totale de fer présente dans l'organisme est de l'ordre de 3 à 4 g. Cette quantité se répartit de trois manières différentes. La majorité du fer est utilisée dans divers processus métaboliques, où il est présent au site actif de protéines (comme l'hémoglobine ou la myoglobine) et enzymes. La deuxième partie du fer est stockée par l'organisme principalement dans le foie et les macrophages ; cette quantité est de l'ordre de 1 g mais varie individuellement. Enfin, la dernière partie du fer est dans la circulation sanguine et représente quelques milligrammes seulement. Les pertes moyennes quotidiennes sont très faibles de l'ordre de 1 à 2 mg, principalement issues de saignements et de desquamation

(Andrews, 1999): il n'existe donc pas de système d'excrétion spécifique du fer du niveau de l'organisme. Ainsi, si les pertes de fer sont aisément compensables par apport alimentaire, les surcharges en fer le sont plus difficilement. Une régulation très fine de ce métal doit être assurée afin d'éviter qu'il ne devienne toxique pour la cellule à trop forte dose (Crichton et al., 2002). En effet, le fer ferreux peut catalyser la réduction de H_2O_2 pour donner le radical hydroxyle très réactif selon la réaction de Fenton (Introduction ; paragraphe II-2a). Le radical hydroxyle est également généré par réaction redox entre l'ion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène par catalyse métallique. C'est la réaction d'Haber Weiss dont l'importance en biologie n'est cependant pas prouvée (Introduction ; paragraphe II-2a).



Ainsi une mauvaise gestion du fer intracellulaire induit l'apparition d'espèces réactives de l'oxygène, s'accompagnant de l'oxydation des molécules voisines de leur site de production comme les acides nucléiques, les lipides, les glucides et les protéines. D'autres réactions radicalaires délétères sont associées à la présence de fer catalytiquement réactif. Les conséquences sont nombreuses et une dérégulation de l'homéostasie du fer a été associée à diverses pathologies, parmi lesquelles l'arthrite rhumatoïde, la maladie de Parkinson, l'athérosclérose, les cancers, la maladie d'Alzheimer et les phénomènes d'ischémie/reperfusion.

II-1.2 Entrée du fer dans les cellules par endocytose

Le fer, présent soit sous forme hémunique (viande) soit sous forme non hémunique (céréales et légumineux) est absorbé au niveau du duodénum. C'est plus particulièrement par les entérocytes qui sont des cellules épithéliales différenciées que s'effectue l'absorption de fer. Une fois dans la circulation, le fer est exclusivement prit en charge par la transferrine dans les conditions physiologiques. La distribution du fer dans les cellules se fait par un mécanisme d'endocytose.

La transferrine est un monomère glycosylé d'environ 80kDa, organisé en deux domaines homologues, et peut fixer deux atomes de fer ferrique, chacun au niveau d'un domaine de la protéine, le lobe N et le lobe C (Beard et al., 1996). Cette fixation du fer à la transferrine est réversible, et synergique à celle d'anions carbonates (Crichton et al., 2002). Le fer est lié à la transferrine par quatre ligands de la protéine : deux tyrosines, une histidine et un aspartate, les

deux derniers ligands provenant du carbonate permettent une coordination octaédrique du métal Fe^{3+} .

La protéine peut ensuite se fixer à son récepteur : un homodimère de 180kDa, présentant dans sa partie N-terminale intracellulaire, un motif YTRF pour l'adressage (Beard et al., 1996). Ce récepteur peut fixer jusqu'à deux molécules de transferrine avec une affinité croissante selon l'état de charge en fer de cette dernière. Lors de l'endocytose, l'endosome est acidifié par l'entrée de protons grâce à une pompe $\text{Na}^+-\text{H}^+-\text{ATPase}$ (Nishi and Forgac, 2002). Cette diminution de pH (jusqu'à environ 5.5) induit un changement de conformation de la transferrine ce qui diminue son affinité pour les atomes de fer (III) fixés auparavant dans le sang à pH neutre. Le fer libéré est ensuite transporté à l'extérieur de l'endosome, dans le cytoplasme, par le transporteur de fer ferreux DMT1. Cette étape nécessite une réduction des ions ferriques par une réductase endosomale, récemment identifiée : Steap3 qui est une ferriréductase dépendante du NADPH (Ohgami et al., 2005).

II-1.3 Système IRP/IRE : bio-marqueur du fer intracellulaire

Comme nous venons de le voir, un bon fonctionnement cellulaire nécessite le maintien permanent d'une quantité de fer adaptée sous une forme utilisable et non toxique. Dans les cellules de mammifères, cette régulation se produit principalement au niveau post-transcriptionnel par un système d'interaction entre les *Iron Regulatory Proteins* (IRP) et un motif *Iron Responsive Element* (IRE) des ARN messagers régulés (Hentze et al., 2004). Les protéines cytosoliques IRP interviennent dans la régulation de la synthèse des protéines impliquées dans le transport (récepteur de la transferrine, DMT1, ferroportine), l'utilisation (synthase de l'acide aminolévulinique érythrocytaire eALAS, aconitase mitochondriale) et le stockage de fer assuré par la ferritine. Cette régulation est possible grâce à la reconnaissance par les IRP des motifs IRE présents sur les parties non codantes de l'ARNm, aux extrémités 3' ou 5' de la partie codante de la séquence de l'ARNm de ces protéines.

Les IRE placés dans la région 5' interfèrent avec l'initiation de la traduction, au niveau de l'association entre l'ARNm et le ribosome, alors que les IRE placés en 3' modulent la stabilité conduisant à la dégradation de l'ARNm. Le motif IRE de la ferritine est situé en 5' de la séquence codante pour les sous-unités L et H de la protéine (Hentze et al., 1987). La fixation de l'IRP inhibe la traduction des gènes par encombrement stérique et empêche ainsi le complexe d'initiation de se former (Muckenthaler et al., 1998) (Figure II-1). L'absence d'IRP au contraire permet sa traduction. Pour le récepteur de la transferrine le schéma est

inversé ; plusieurs IRE sont présents en 3' de la séquence codante pour la protéine. Ainsi la fixation de l'IRP protège l'ARNm de l'attaque nucléolytique (Figure II-1) et augmente la synthèse de la protéine (Erlitzki et al., 2002).

La protéine IRP1 est présente sous deux formes mutuellement exclusives ; une forme aconitase avec un centre [4Fe-4S], et une forme sans cluster capable de se fixer sur le motif IRE des ARNm (Haile et al., 1992). Quand la concentration en fer est suffisante, IRP1 assemble un centre [4Fe-4S] et perd toute affinité pour l'ARNm : ainsi la traduction du récepteur de la transferrine est défavorisée et celle de la ferritine est au contraire permise. La ferritine peut alors stocker le fer en excès. Au contraire, lorsque la concentration en fer devient trop faible, il est nécessaire d'augmenter la synthèse de récepteur de la transferrine pour apporter du fer aux cellules et d'arrêter la synthèse de ferritine. Dans cette condition, IRP1 perd son cluster et se fixe au motif IRE en augmentant la synthèse du récepteur de la transferrine par stabilisation de l'ARNm comme précédemment décrit. La protéine IRP1 régule son activité par un mécanisme d'assemblage-désassemblage de son centre [4Fe-4S], sans impliquer de synthèse *de novo* de la protéine (Pantopoulos and Hentze, 1995). Quand la concentration en fer dans les cellules est suffisante IRP2, au contraire d'IRP1, est rapidement dégradée par le protéasome suite à son ubiquitinylation (Guo et al., 1995b; Iwai et al., 1998). Une synthèse *de novo* de la protéine est donc nécessaire pour retrouver l'état d'activité observé dans une situation de carence en fer.

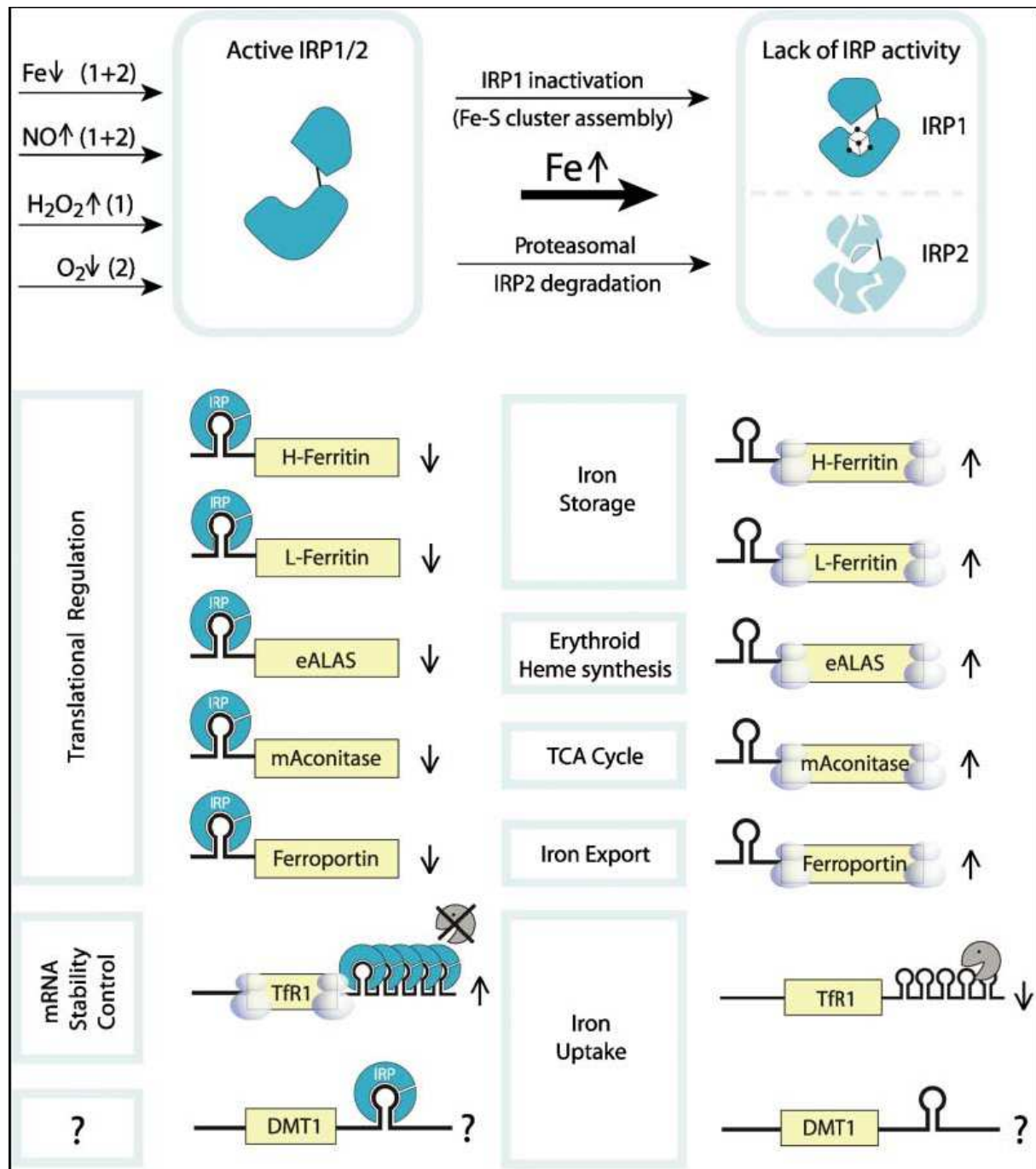


Figure II-1 : Régulation cellulaire de l'homéostasie du fer par le système *IRP-IRE* (Hentze et al., 2004). Cette figure n'est pas exhaustive des cibles des IRP et présente les cibles principales intervenant dans la régulation de la synthèse des protéines permettant le maintien de l'homéostasie du fer.

II-2. Présentation des axes de travail.

Comme il a été observé au chapitre précédent, la présence de cadmium induit l'apparition d'espèces réactives de l'oxygène. Parmi les mécanismes possibles est proposée l'interaction du cadmium avec le fer potentialisant l'apparition de ROS suite à la présence de quantité de fer réactif trop importante dans la cellule (Puntarulo, 2005). Le cadmium peut aussi engendrer des situations d'anémies plus ou moins importantes (Horiguchi et al., 1996). Ainsi, il semble que la présence de cadmium dans les cellules provoque un déséquilibre global en métaux essentiels comme le fer (Martelli et al., 2006). L'objectif de ce travail a été d'étudier quelles étaient les conséquences de l'exposition au cadmium sur l'homéostasie d'un métal capable de former des réactions d'oxydation ou de réduction : le fer. Pour cela, nous avons choisi deux modèles : des souris femelles C57BL6, ainsi que, pour comparaison, les lignées cellulaires épithéliales présentées au chapitre précédent. Les souris ont été intoxiquées par voie orale, en ayant libre accès à l'eau de boisson contenant 100 ou 200 ppm de chlorure de cadmium pendant trois semaines. Après avoir dosé le cadmium ainsi que d'autres éléments et avoir effectué la numération sanguine, la toxicité du cadmium a été étudiée au niveau cellulaire. La régulation cellulaire du fer est principalement assurée par le système IRP (*Iron Regulatory Proteins*) / IRE (*Iron Responsive Element*) qui agit sur la traduction de protéines importantes dans la gestion du fer. Nous avons donc étudié l'effet du cadmium sur ce bio-marqueur de fer cellulaire. Les études de l'impact du cadmium sur le système IRP/IRE ont également été réalisées sur les lignées épithéliales HeLa et HZR, qui présentent une résistance très distincte vis-à-vis du cadmium suite à une exposition de 24 heures. La présence du cadmium interfère différemment avec le système IRP/IRE sur les deux lignées cellulaires, ce qui illustre la diversité des réponses à un stress cadmium suivant des conditions cellulaires.

II-3. ARTICLE 2: Effect of cadmium stress on the mammalian Iron Regulatory Proteins

Effect of cadmium stress on the mammalian Iron Regulatory Proteins

Estelle Rousselet, Jean-Marc Moulis

Institut de Recherches en Sciences et Technologies du Vivant, CEA; CNRS; Université Joseph Fourier, Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux (UMR 5249), 17 rue des Martyrs, F-38054 Grenoble, France

Keywords:

Cadmium toxicity; iron homeostasis; zinc resistance; transferrin receptor; RNA-binding proteins

Abbreviations used:

IRP: Iron Regulatory Protein; IRE: Iron Responsive Element; EMSA: Electrophoretic Mobility Shift Assay; DMT1: Divalent Metal Transporter 1; HZR: High Zinc Resistant HeLa cells; PBS: Phosphate buffered saline; SD, standard deviation

Correspondence:

* Jean-Marc Moulis, CEA-Grenoble,IRSTV/LCBM, 17 rue des Martyrs, F-38054 Grenoble Cedex 9, France. Tel : (33) 4 38 78 56 23 ; e-mail : jean-marc.moulis@cea.fr

Conflict of Interest Statements for Authors

The authors declare no conflicts of interest

Abstract

Disruption of iron homeostasis at the level of intestinal absorption or erythropoiesis contributes to cadmium toxicity. Cellular iron homeostasis in metazoans is maintained by the Iron Regulatory Proteins which regulate the synthesis of proteins involved in transport, use, and storage of iron. Here, separate groups of mice had free access to different doses of cadmium in the drinking water for three weeks, and the metal accumulated in all analyzed organs. The increase of cadmium concentration in mouse tissues did not correlate with changes of the activity of the Iron Regulatory Proteins. The intoxicated mice did not show any sign of anemia. Thus cadmium interference with iron homeostasis is delayed after the onset of cadmium accumulation. Cellular models of human epithelial cells were also subjected to cadmium stress and consequences on iron homeostasis were measured. Cadmium exposure of HeLa cells decreased the total amount of Iron Regulatory Proteins with subsequent decrease of the transferrin receptor mRNA. A zinc-resistant clone derived from HeLa cells was not similarly sensitive to the cadmium insult. These data emphasize that cadmium can impact iron homeostasis in mammalian cells, but that the cellular response depends on several parameters, such as the way divalent cations are handled by the cells.

1. Introduction

As a widespread pollutant and a metal with various technological uses, cadmium has long been studied for its deleterious effects on mammals and other living species (Deckert, 2005; Satarug et al., 2003; Satoh et al., 2002). A striking conclusion that can be drawn from the large number of studies carried out over the years is the diversity of toxicity mechanisms that have been associated with cadmium intoxication (Martelli et al., 2006; Waalkes, 2003). Perturbation of essential metals homeostasis underlies many of the involved processes (Goyer, 1997; Martelli et al., 2006). The number of pathologies related to cadmium exposure is quite large (Satoh et al., 2002; Waalkes, 2003). Among them, iron deficiency anemia has been evidenced (Hays and Margaretten, 1985; Schafer et al., 1990). Decreased production of erythropoietin from poisoned kidneys is a likely contributor to the symptom (Horiguchi et al., 2000; Horiguchi et al., 1994; Obara et al., 2003). Other important steps of iron homeostasis, such as iron absorption from the diet (Bressler et al., 2004; Elisma and Jumarie, 2001; Ryu et al., 2004), contribute to cadmium toxicity. Therefore further investigations of cadmium effects on iron homeostasis are needed to fully evaluate cadmium interference with iron homeostasis.

At the cellular level, iron homeostasis is maintained by Iron-Regulatory Proteins. The two known members, iron-regulatory proteins 1 and 2 (IRP1 and IRP2), bind with high affinity to RNA motifs called Iron-Responsive Elements (IRE) in the untranslated sequences of several transcripts. Among the regulated proteins, Divalent Metal Transporter 1 (DMT1) has been shown to uptake cadmium in enterocytes, and iron-deficient animals are more sensitive to cadmium intoxication than iron-replete ones (Bressler et al., 2004; Elisma and Jumarie, 2001; Ryu et al., 2004). The activity of the regulators is modulated in different ways: IRP1 is a bifunctional protein which contains a [4Fe-4S] cluster and functions as cytosolic aconitase, interconverting citrate and isocitrate, in iron loaded cells. Unlike IRP1, IRP2 undergoes iron-dependent degradation in iron-replete cells (Guo et al., 1995b; Iwai et al., 1998). Under iron starvation, the [4Fe-4S] cluster of IRP1 is dismantled and the apoprotein binds IRE, whereas IRP2 is stabilized and interacts with the RNA motif. For DMT1 in enterocytes the latter condition enhances iron and other substrates uptake by the transporter (Gunshin et al., 2001).

The influence of cadmium exposure on the IRP-centered regulating system does not seem to have been previously investigated. Therefore, groups of mice have been intoxicated by adding cadmium to drinking water in the present study. The doses of cadmium were chosen as to induce accumulation of the metal in all considered organs to concentrations largely

exceeding those considered safe in various human populations (Satarug et al., 2003). Selected organs have been analyzed by measuring the IRP activity in relation with the metal concentration of these tissues. To complement these *in vivo* studies, the Iron Regulatory system of human epithelial cell lines has been studied under cadmium stress leading to cell death within 24 hours. A comparison was made with a clone selected on high concentrations of the cadmium antagonist zinc. Cadmium does impact the IRP system but not in all conditions tested. Therefore, analysis of iron homeostasis is a useful implementation to fully understand the cellular response to cadmium exposure in animal cells.

2. Materials and methods

2.1. Animals and treatments

The experiments involved three groups of 4 female mice (strain C57BL/6) aged 4-8 weeks at the start of the experiment. All groups were fed a diet containing all nutrients in amounts that equaled the recommendations for laboratory mice (Special Diet Services, product code 801002, Witham, Essex, UK) including 114 mg of iron /kg. Cadmium intoxication of the animals was carried out by adding 100 mg/L or 200 mg/L (ppm) cadmium chloride (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) to drinking water for three weeks, whereas non-exposed animals were given distilled-deionized water. Mice had unlimited access to drinking water. They were sacrificed by CO₂ inhalation and the organs of interest were removed, in accordance with Atomic Energy Commission Care and Use Committee.

2.2. Blood parameters measurements

Blood samples were collected with S-Monovette systems (Sarstedt, Nümbrecht, Germany). Hemoglobin concentrations, hematocrit, red blood cells counts, mean corpuscular volume, platelets and white blood cells levels were determined in the whole blood with a ABX Pentra 120 automated hematology analyzer (Diamond Diagnostics, Holliston, MA, USA).

2.3. Tissue lysate preparation

Tissues of killed animals were quickly removed after death, rinsed with cold Phosphate buffered saline (PBS), and frozen in liquid-N₂ under argon. Storage was at -80°C. Immediately before experiments, tissues were ground in liquid-N₂-cooled mortars and lysed in degassed buffer containing 10 mM Hepes pH 7.6, 3 mM MgSO₄, 40 mM KCl, 10% Glycerol, 1% of a cocktail of protease inhibitors devoid of metal chelators (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in the presence of 1% Triton X-100, for 10 min at 4°C. Nuclei and debris were removed by centrifugation at 17860xg for 40 min at 4°C. All manipulations aimed at

measuring protein and enzyme activities were carried out with a specialized argon line ensuring oxygen-free conditions for the samples.

2.4. Cell Cultures

Epithelial human cervix carcinoma (HeLa) cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) with 2 mM L-glutamine supplemented with 5% fetal bovine serum. Cells were incubated at 37°C with 5% CO₂. High Zinc Resistant (HZR) cells (Chimienti et al., 2001) were routinely grown as HeLa cells in the same medium supplemented with 200 µM zinc acetate.

2.5. Electrophoretic Mobility Shift Assay

Sub-confluent HeLa and HZR cells were treated with different concentrations of cadmium for 24 hours. In the case of HZR cells, the zinc concentration in the medium was replaced by the required cadmium acetate concentration 24 h before analysis. HZR control cells were maintained in 200 µM zinc acetate. Cells were harvested and rinsed with PBS three times. The pellets were re-suspended and left for 15 min at 4°C in 200 µl of lysis buffer (see above) in the presence of 30 µg/ml digitonin. After freezing and thawing three times, the mixture was centrifuged at 17500xg for 30 min at 4°C, and the supernatant was used for activity measurements.

All experiments using the Iron-Responsive Element probe were carried out in diethyl pyrocarbonate-treated solutions. A human ferritin H-chain IRE probe was ³³P-labeled as described (Pantopoulos and Hentze, 1995), using T7 RNA polymerase (Fermentas, obtained from Euromedex, Mundolsheim, France) acting on the *Xba*I-linearized pTI-1 plasmid (Brazzolotto et al., 1999), and a mixture of ribonucleoside triphosphates containing [α -³³P]UTP. The reaction mixture was separated by denaturing electrophoresis on a 7 M urea/20% acrylamide gel in 0.5× Tris borate-EDTA buffer, and the labeled probe was extracted in 0.5 M ammonium acetate, 0.5 mM EDTA, 0.1% SDS before ethanol precipitation.

Twenty five µg of soluble protein lysate were assayed in a final volume of 10 µl. IRP binding to the probe was carried out for 20 min in 10 mM Hepes, pH 7.6, 3 mM MgSO₄, 40 mM KCl with 0.4 unit of placental ribonuclease inhibitor (Fermentas). All assays were duplicated with 2% (v:v) 2-mercaptoethanol (2-ME) to activate all IRP present in the sample. Five mg/ml of heparin were then added, and incubation was continued for 10 min. One µl of 50% glycerol with 0.05% bromphenol blue was added to each reaction mixture. The samples were separated on a nondenaturing 5% acrylamide gel in 0.25× Tris borate-EDTA buffer after 1 h of pre-electrophoresis at 80 V. The gel was run for 75 min at a constant voltage of 80 V

and dried under vacuum. The radioactive bands were analyzed by quantitative autoradiography (PhosphorImager, Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA).

2.6. Western-Blot experiments

In experiments aimed at analyzing proteins only by Western blot, soluble proteins were extracted with 100 µl of the above lysis buffer containing 0.25% Nodinet P40 with 3 freezing / thawing cycles.

The protein content of cell lysates was measured using the BioRad protein assay. Twenty µg of proteins were loaded, after boiling for 5 min in sample buffer, onto 8 % SDS-polyacrylamide gels. After electrophoresis, the proteins were electro-transferred to a nitrocellulose membrane at 225 mA for 1 h in Tris-Glycine pH 8.3 containing 20% (v:v) methanol. The membrane was stained with Ponceau Red (3-hydroxy-4-[2 sulfo-4-(4-sulfo-phenylazo) phenylazo]-2,7-naphtalene disulfonic acid) to confirm the homogenous transfer of proteins of all sizes.

The membrane was blocked with PBS, 0.1 % Tween 20 containing 5% skim milk and incubated with anti-IRP1 rabbit serum (Martelli and Moulis, 2004) diluted 1:600 in blocking buffer for 1 h. The membrane was washed with PBS-T (0.1%) and incubated for 1 h with Goat antirabbit IgG Alkaline Phosphatase conjugated (Sigma-Aldrich) antibodies diluted 1:5000 in blocking buffer and washed repeatedly. The labeled proteins were detected using a chromogenic substrate (Sigma Fast® 5-Bromo, 3-Chloro, 3-Indolyl Phosphate/ Nitric Blue Tetrazolium tablet).

2.7. Elemental analysis of samples

The amount of a series of elements present in samples was determined by Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry on a Varian, Vista MPX instrument as described (Martelli et al., 2007). Cell pellets were vacuum-dried and mineralized in 70% nitric acid before analysis. The cadmium and iron contents were referred to the amount of cells in the analyzed pellet. In the case of tissues, frozen pieces were ground in liquid nitrogen and poured into pre-weighted tubes. They were dried over several days under a chemical hood. The analyses were carried out as for cell pellets and the values were referred per mass unit of dried tissue.

2.8. Detection of the transferrin receptor transcript

Total RNA were purified and reverse transcriptase coupled to polymerase chain reaction were performed as already described, as was signal quantification (Brazzolotto et al., 2003). The intensity of the transferring receptor band was compared to that of β -actin from the same sample by adjusting the template concentrations to the absolute amount of each transcript. The samples were initially checked for the absence of any contaminating DNA.

2.9. Statistical analysis

All experimental results were tested with analysis of Student t-test for unpaired data with unequal variance.

3. Results

3.1. Observation of cadmium intoxicated mice and metal analysis

At the time of sacrifice, feces of mice treated with 200 ppm CdCl_2 in drinking water were liquid and the spleens were bulkier than those of the control group. This observation is a first indication that the animals exposed to the highest cadmium concentrations do experience some toxicity from the heavy metal. The diarrheal disorder may be taken as the sign of intestinal fluid and ionic imbalance in the most exposed animals (Kunzelmann and Mall, 2002). However, no differences in the weights of other organs than the spleen were observed between control and cadmium-exposed mice.

The concentrations of cadmium in all measured organs increased with the cadmium concentration in drinking water as reported elsewhere (Viau et al., submitted for publication). Cadmium burden was highest in the kidneys, 129.0 (SD 17.5) $\mu\text{g/g}$ of tissue, and intestine, 97.5 (SD 28.5) $\mu\text{g/g}$, whereas cadmium concentration in the liver, 67.4 (SD 3) $\mu\text{g/g}$ of tissue, was far larger than in the spleen, 7.3 (SD 1.6) $\mu\text{g/g}$ of tissue, for mice exposed to 200 ppm cadmium chloride.

3.2. Iron status of cadmium poisoned mice

The relative amount of iron did not strongly depend on the cadmium treatments in most organs (Fig. 1). In the presence of 100 and 200 ppm cadmium in the drinking water iron is less abundant in the liver and intestines than in the absence of the toxic metal. Significant variations were detected neither for other organs (kidneys, lungs, spleen, and thymus) nor for other elements. Besides isolated organs, blood parameters were also measured (Table 1). They did not show significant differences between the two extreme conditions to which animals were exposed (0 and 200 ppm cadmium) and the measured values indicated that the mice were not anemic.

These results show that large cadmium concentrations in the drinking water do not perturb the main hematological parameters and that the subsequent cadmium accumulation in organs does not induce body iron redistribution under the implemented experimental conditions. However these data do not give access to the way iron was handled inside cells under cadmium stress. Thus the status of the iron regulatory system that acts as a cellular sensor for the metal was investigated.

Western blots detecting IRP1 in the kidneys of mice treated or not with 200 ppm cadmium chloride in drinking water are shown in Figure 2. Kidneys were chosen because they are the organs accumulating most cadmium per mass unit. No differences were found in the amount of IRP1 in any of the mice. Similarly the amount of IRP1 in livers did not change in lysates of control mice and those of mice treated with 200 ppm cadmium (Fig. 2).

The IRE-binding activities of IRP in the liver and the kidneys were also measured. The IRP1-IRE complex of mice has a slower migration than the IRP2-IRE complex in gel-shift assays (Guo et al., 1995a): this property allows one to detect the activities of both proteins on the same sample. In the liver and kidneys, the IRP2-IRE complex was not revealed by gel-shift assays for any of the implemented conditions (Fig. 3). This shows that these organs were not iron-depleted since IRP2 concentration is inversely related to intracellular iron availability (Samaniego et al., 1994). In both liver and kidneys (Fig. 3, (-) lanes), cadmium exposure did not increase the spontaneous IRE-binding activity of IRP1 in gel-shift assays. The signal of the IRP1-IRE complex was very weak and it was strongly enhanced by addition of 2% (v/v) 2-mercaptoethanol. This result indicates that IRP1 was mainly present in a latent form in these lysates. The most abundant latent form of IRP1 is the enzyme cytosolic aconitase (Haile et al., 1992). Therefore, cadmium does not enhance the IRE-binding activity of IRP1 and it does not stabilize IRP2 in mice organs. It thus seems unlikely that cadmium induces major deregulation of cellular iron homeostasis in the liver and kidneys of mice under the implemented conditions.

In order to get access to the organs that were found to accumulate cadmium, the toxic metal, as administrated here, has to cross several biological barriers, including some organized around epithelial cells. Therefore complementary experiments to those described above have been carried out for comparison with isolated epithelial cells.

3.3. Exposure of epithelial cell lines to cadmium and effect on iron homeostasis

HeLa cells are a largely used model of human epithelial cells. A clone derived from this cell line by progressive adaptation to increasing zinc concentrations and called High Zinc Resistant (HZR) has been described (Chimienti et al., 2001). HZR cells have been shown to withstand higher doses of cadmium acetate than HeLa cells: for HZR cells the half-maximal lethal dose was determined at 250 μM after 24 hours of cadmium exposure as compared to a half-maximal lethal concentration of 7 μM for HeLa cells (Rousselet et al. in preparation). In both cell lines effects of intracellular cadmium on the cellular iron regulatory system were investigated.

First, the total amount of IRP1 in cells was measured by Western blot analysis after cadmium treatments. Soluble proteins were extracted and the β -actin signal was used as loading control. In HeLa cells the IRP1 / β -actin ratio decreased as a function of cadmium exposure (Fig. 4). The relative intensity of the IRP1 signal for cells stressed by 2 μM cadmium decreased as compared to the control HeLa cells. At a cadmium concentration (7 μM) maintaining only 50% of viable cells after 24 h, the intensity of the IRP1 signal decreased to ca. 40% of that of control cells (Fig. 4). Samples obtained from five independent experiments (cell cultures and Western blots) were averaged to obtain these values. Therefore exposure of HeLa cells to cadmium decreases the relative amount of IRP1 in parallel with the loss of viability.

Since only adherent cells were considered in these experiments, this result indicates that IRP1 stability in viable cells is sensitive to cadmium. This conclusion contrasts with the usual behavior of IRP1 under most stress conditions. The regulator is considered a fairly stable protein which generally participates to the cellular response by balancing between its two activities, namely aconitase and IRE-binding. It is therefore often proposed that IRP1 may substitute for IRP2 when the latter unstable protein is degraded (Meyron-Holtz et al., 2004).

The relative amount of IRP1 in HZR cells is approximately the same as in HeLa cells under standard growth conditions (Fig. 4). In HZR cells exposed to 100 μM of Cd the intensity of the IRP1 signal was not significantly different from that of control cells (Fig. 4). The apparent decrease of this value for cells exposed to 250 μM of cadmium could not be considered significant when a series of five independent experiments were analyzed. Therefore, the relative amount of IRP1 in adherent HZR cells exposed to 250 μM Cd did not decrease in contrast with what was observed with HeLa cells exposed to 7 μM of cadmium, i.e. under conditions affording the same viability of the two cell lines after 24 h of exposure.

Since the sensitivity of IRP1 to cadmium appeared different in the two cell lines, the IRE-binding activities were measured by gel-shift assays (Fig. 5). The combined IRP1 and IRP2 activities are detected in gel shift assays since the two IRP-IRE complexes of human cells migrate to the same position in non-denaturing gels. In HeLa cells, signal quantification indicated that the total amount of IRP, i.e. that revealed with 2% 2-mercaptoethanol, decreased by a factor close to two upon exposure to 7 μM Cd (Fig. 5C, left), a value that is consistent with previous quantification of IRP1 detected by Western blots (Fig. 4). In contrast, signal quantification of the total amount of IRP did not change when HZR cells were exposed to 250 μM Cd (Fig. 5C, right), again in agreement with results of Western blots (Fig. 4).

In the absence of cadmium, the proportion of active IRP was higher in HZR cells, at ca.75%, than in HeLa cells in which it is close to 20% (Fig. 5B). In HeLa cells the proportion of active IRP was weak and did not change much with increasing cadmium concentrations although the total amount of protein decreased. In HZR cells maintained in 200 μM zinc, IRP is mainly an IRE-binding protein and this feature does not change when cadmium replaces zinc (Fig. 5).

Therefore, the main effect of cadmium in these experiments is to decrease the amount of IRP1 in HeLa cells. The targets of the IRP system should also be sensitive under these conditions. This has been measured semi-quantitatively by estimating the amount of transferrin receptor transcript. This messenger RNA has five IRE motifs on its 3' untranslated sequence and it is stabilized by IRP binding (Pantopoulos, 2004). The relative amount of transferrin receptor mRNA was indeed smaller in HeLa cells exposed to 5 μM of cadmium than in the absence of the toxic metal, whereas it did not change in HZR cells (Fig. 6). These results are in agreement with the decrease of total IRP1 observed in HeLa cells upon cadmium exposure (Fig. 5C) without any increase of the active fraction of the protein (Fig. 5B). For HZR cells, no changes were expected since the IRP system of these cells seems insensitive to the applied cadmium treatments (Fig. 5).

4. Discussion

Most data dealing with cadmium toxicity clearly evidence the involvement of cellular redox imbalance as an important mechanism. Although the affinity of cadmium for free thiols explains many of its deleterious effects, alternative or additional mechanisms may occur (Martelli et al., 2006). Among them, deregulation of iron homeostasis displays many features that may contribute to the cellular fate upon cadmium exposure. First, cellular failure to

properly handle iron is a major cause of oxidative stress (Puntarulo, 2005; Terman and Brunk, 2006). Second, cadmium intoxication as implemented in the present study has been found to induce splenomegaly at the highest applied doses (200 mg/ml of drinking water). Enlarged spleens have already been observed after cadmium poisoning (Hamada et al., 1998; Maitani and Suzuki, 1982; Pathak and Khandelwal, 2007). Disturbed iron distribution in spleen of rats given high doses of cadmium was observed (Hamada et al., 1998), most probably as a result of impaired red blood cells degradation and iron recycling. Third, the liquid feces of the most exposed animals studied here reveal a significant ionic balance defect across the intestinal barrier (Kunzelmann and Mall, 2002). As the major intestinal iron transporter has been demonstrated to be responsible for cadmium absorption (Bressler et al., 2004; Ryu et al., 2004), it might be expected that cadmium intoxication perturbs iron homeostasis. Therefore all these observations have paved the way to investigate the cellular iron regulatory system under cadmium stress.

Elemental analysis of the organs of mice exposed to cadmium salt in the drinking water showed that the applied treatments induce cadmium accumulation in the studied organs (Viau et al., submitted for publication). Therefore, these experimental conditions do lead to cadmium intoxication of the animals, although they were less invasive than in some other studies using higher doses or other administration routes (e.g. intra-peritoneal or subcutaneous) routes. In tissues accumulating the highest cadmium concentrations, no changes were observed in the amount of IRP1. The resting protein was mainly inactive toward IRE binding and it was efficiently activated in vitro by treatment with the reducing agent, 2-mercaptoethanol. These results imply that IRP1 is present as cytosolic aconitase, as observed in most tissues under normal conditions (Meyron-Holtz et al., 2004). Furthermore, no signals of IRP2 activity were detected indicating that none of the studied animals, including those treated with the highest cadmium concentration, were iron starved at the cellular level. This observation agrees with the normal blood parameters measured for the same mice. Therefore, cadmium accumulation in organs such as liver or kidney has no direct effect on the cellular iron regulatory system under the implemented conditions. This conclusion holds despite signs of potential systemic perturbation, such as splenomegaly and diarrhea.

Cadmium trafficking in intoxicated mice requires movements of the toxic ions through a variety of cell types, including epithelial ones. The results obtained with mouse tissues were thus compared with data from a human epithelial model. HZR cells have been obtained by selection from HeLa cells in the presence of zinc and they have been shown to be more

sensitive to oxidative stress than their parent line (Chimienti et al., 2001). Standard growth conditions between HeLa and HZR cells differ only by the presence of 200 μ M of zinc in the medium used for the latter. Measurements of IRP1 indicate that the two cell lines have the same amount of this regulator under these conditions. However, a higher IRE-binding activity is present in resting HZR cells than in HeLa cells. This difference agrees with the decreased resistance of HZR cells to oxidative stress, a condition known to activate IRP1 (Mueller, 2005; Pantopoulos, 2004).

As in the case of mouse tissues, the IRP activity of HeLa cells is low, with less than 50% of the total protein being present as the IRE-binding form (Fig. 5). This observation may be associated with the higher iron concentration of endometrial cancer cells as compared to non-cancerous tissues (Yaman et al., 2007), thus favoring the aconitase form of IRP1. Cadmium was found to have little influence on this proportion in HeLa cells, but the total amount of IRP was significantly decreased by exposure to cadmium. Therefore, the major effect of cadmium in HeLa cells is to destabilize IRP1 and a secondary observation is that cadmium does not change the ratio of active/latent protein. It follows that either both forms of IRP1, cytosolic and IRE binding, are equally sensitive to cadmium exposure or one of them is more sensitive but the cell keeps the ability to maintain the same proportions of the different forms. In this respect, studies with purified proteins have demonstrated the preferential instability of the IRE-binding form in the presence of cadmium and zinc cations (Martelli and Moulis, 2004). Also, the amount of IRP1 in different tissues varies (Cairo and Pietrangelo, 2000) and this may indicate that the factors stabilizing IRP1 are not equally distributed in different cell types. In any case, cadmium does target IRP1 by selectively degrading it in HeLa cells remaining viable after exposure, as witnessed by the decrease of transferrin receptor transcript for instance.

In contrast, the cadmium stress applied to HZR cells does not impact the IRP system in the same way as for HeLa cells. The relatively high IRE-binding activity in these cells does not significantly change upon cadmium exposure and the total amount of protein stays the same. Therefore, HZR cells have ways, which are not active in HeLa cells, to protect IRP1 under cadmium stress. In agreement with this conclusion, no significant variations of the transferrin receptor transcript have been detected upon 100 μ M cadmium treatment and zinc removal (Fig. 6). The available data do not allow us to speculate on the relevant mechanisms at this stage, but they may be related to the initial high zinc content of these cells (Chimienti et al., 2001) and the protection that may be exerted by this metal against cadmium insult.

This study highlights the versatility of the cellular response involving iron regulation to cadmium exposure. Whereas mouse tissues accumulating cadmium did not display changes of the iron regulatory system, the two related epithelial cell lines studied here were differently able to protect their IRP1 protein. This suggests that the sensitivity of cells and organs to cadmium depends on a series of parameters that remain to be comprehensively delineated and that their iron regulatory system may be part of the cellular response toward this toxic element at least in some cases. It has been recently proposed from the available data about mammalian cadmium toxicity that many mechanisms heavily relied on signaling systems and impacted the homeostasis of essential metals (Martelli et al., 2006). Notably the iron regulatory system is subject to regulation by phosphorylation (Pantopoulos, 2004). For this and other reasons the detailed comparison of the HZR and HeLa cell lines and their use in studying cadmium toxicity in will be the subject of future studies.

Acknowledgements:

Muriel Viau and Serge Candeias are thanked for invaluable help and advice with animal care and dissection. We are grateful to Antonia Alonso and Pierre Richaud for their contributions to blood parameters measurements and elemental analysis, respectively. This work was supported by a grant from the '*Toxicologie Nucléaire et Environnementale*' program implemented by several research organizations.

References

- Brazzolotto, X., Gaillard, J., Pantopoulos, K., Hentze, M.W. and Moulis, J.M. (1999) Human cytoplasmic aconitase (Iron regulatory protein 1) is converted into its [3Fe-4S] form by hydrogen peroxide in vitro but is not activated for iron-responsive element binding. *J Biol Chem* 274, 21625-21630.
- Brazzolotto, X., Andriollo, M., Guiraud, P., Favier, A. and Moulis, J.M. (2003) Interactions between doxorubicin and the human iron regulatory system. *Biochim Biophys Acta* 1593, 209-218.
- Bressler, J.P., Olivi, L., Cheong, J.H., Kim, Y. and Bannona, D. (2004) Divalent metal transporter 1 in lead and cadmium transport. *Ann N Y Acad Sci* 1012, 142-152.
- Cairo, G. and Pietrangelo, A. (2000) Iron regulatory proteins in pathobiology. *Biochem J* 352 Pt 2, 241-250.
- Chimienti, F., Jourdan, E., Favier, A. and Seve, M. (2001) Zinc resistance impairs sensitivity to oxidative stress in HeLa cells: protection through metallothioneins expression. *Free Radic Biol Med* 31, 1179-1190.
- Deckert, J. (2005) Cadmium toxicity in plants: is there any analogy to its carcinogenic effect in mammalian cells? *Biometals* 18, 475-481.
- Elisma, F. and Jumarie, C. (2001) Evidence for cadmium uptake through Nramp2: metal speciation studies with Caco-2 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 285, 662-668.
- Goyer, R.A. (1997) Toxic and essential metal interactions. *Annu Rev Nutr* 17, 37-50.
- Gunshin, H., Allerson, C.R., Polycarpou-Schwarz, M., Rofts, A., Rogers, J.T., Kishi, F., Hentze, M.W., Rouault, T.A., Andrews, N.C. and Hediger, M.A. (2001) Iron-dependent regulation of the divalent metal ion transporter. *FEBS Lett* 509, 309-316.
- Guo, B., Brown, F.M., Phillips, J.D., Yu, Y. and Leibold, E.A. (1995a) Characterization and expression of iron regulatory protein 2 (IRP2). Presence of multiple IRP2 transcripts regulated by intracellular iron levels. *J Biol Chem* 270, 16529-16535.
- Guo, B., Phillips, J.D., Yu, Y. and Leibold, E.A. (1995b) Iron regulates the intracellular degradation of iron regulatory protein 2 by the proteasome. *J Biol Chem* 270, 21645-21651.
- Haile, D.J., Rouault, T.A., Tang, C.K., Chin, J., Harford, J.B. and Klausner, R.D. (1992) Reciprocal control of RNA-binding and aconitase activity in the regulation of the iron-responsive element binding protein: role of the iron-sulfur cluster. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 7536-7540.
- Hamada, T., Tanimoto, A., Arima, N., Ide, Y., Sasaguri, T., Shimajiri, S., Murata, Y., Wang, K.Y. and Sasaguri, Y. (1998) Pathological study of splenomegaly associated with cadmium-induced anemia in rats. *J Uoeh* 20, 11-19.
- Hays, E.F. and Margaretten, N. (1985) Long-term oral cadmium produces bone marrow hypoplasia in mice. *Exp Hematol* 13, 229-234.
- Horiguchi, H., Teranishi, H., Niiya, K., Aoshima, K., Katoh, T., Sakuragawa, N. and Kasuya, M. (1994) Hypoproduction of erythropoietin contributes to anemia in chronic cadmium intoxication: clinical study on Itai-itai disease in Japan. *Arch Toxicol* 68, 632-636.
- Horiguchi, H., Kayama, F., Oguma, E., Willmore, W.G., Hradecky, P. and Bunn, H.F. (2000) Cadmium and platinum suppression of erythropoietin production in cell culture: clinical implications. *Blood* 96, 3743-3747.
- Iwai, K., Drake, S.K., Wehr, N.B., Weissman, A.M., LaVaute, T., Minato, N., Klausner, R.D., Levine, R.L. and Rouault, T.A. (1998) Iron-dependent oxidation, ubiquitination, and degradation of iron regulatory protein 2: implications for degradation of oxidized proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 4924-4928.
- Kunzelmann, K. and Mall, M. (2002) Electrolyte transport in the mammalian colon: mechanisms and implications for disease. *Physiol Rev* 82, 245-289.
- Maitani, T. and Suzuki, K.T. (1982) Changes of essential metal levels in selected tissues and splenomegaly induced by the injection of suspending cadmium salt into mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 62, 219-227.
- Martelli, A. and Moulis, J.-M. (2004) Zinc and cadmium specifically interfere with RNA-binding activity of human iron regulatory protein 1. *J Inorg Biochem* 98, 1413-1420.

- Martelli, A., Rousselet, E., Dycke, C., Bouron, A. and Moulis, J.-M. (2006) Cadmium toxicity in animal cells by interference with essential metals. *Biochimie* 88, 1807-1814.
- Martelli, A., Salin, B., Dycke, C., Louwagie, M., Andrieu, J.-P., Richaud, P. and Moulis, J.-M. (2007) Folding and turnover of human iron regulatory protein 1 depend on its subcellular localization. *Febs J* 274, 1083-1092.
- Meyron-Holtz, E.G., Ghosh, M.C. and Rouault, T.A. (2004) Mammalian tissue oxygen levels modulate iron-regulatory protein activities in vivo. *Science* 306, 2087-2090.
- Mueller, S. (2005) Iron regulatory protein 1 as a sensor of reactive oxygen species. *Biofactors* 24, 171-181.
- Obara, N., Imagawa, S., Nakano, Y., Suzuki, N., Yamamoto, M. and Nagasawa, T. (2003) Suppression of erythropoietin gene expression by cadmium depends on inhibition of HIF-1, not stimulation of GATA-2. *Arch Toxicol* 77, 267-273.
- Pantopoulos, K. and Hentze, M.W. (1995) Nitric oxide signaling to iron-regulatory protein: direct control of ferritin mRNA translation and transferrin receptor mRNA stability in transfected fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 1267-1271.
- Pantopoulos, K. (2004) Iron metabolism and the IRE/IRP regulatory system: an update. *Ann N Y Acad Sci* 1012, 1-13.
- Pathak, N. and Khandelwal, S. (2007) Role of oxidative stress and apoptosis in cadmium induced thymic atrophy and splenomegaly in mice. *Toxicol Lett* 169, 95-108.
- Puntarulo, S. (2005) Iron, oxidative stress and human health. *Mol Aspects Med* 26, 299-312.
- Ryu, D.Y., Lee, S.J., Park, D.W., Choi, B.S., Klaassen, C.D. and Park, J.D. (2004) Dietary iron regulates intestinal cadmium absorption through iron transporters in rats. *Toxicol Lett* 152, 19-25.
- Samaniego, F., Chin, J., Iwai, K., Rouault, T.A. and Klausner, R.D. (1994) Molecular characterization of a second iron-responsive element binding protein, iron regulatory protein 2. Structure, function, and post-translational regulation. *J Biol Chem* 269, 30904-30910.
- Satarug, S., Baker, J.R., Urbenjapol, S., Haswell-Elkins, M., Reilly, P.E., Williams, D.J. and Moore, M.R. (2003) A global perspective on cadmium pollution and toxicity in non-occupationally exposed population. *Toxicol Lett* 137, 65-83.
- Satoh, M., Koyama, H., Kaji, T., Kito, H. and Tohyama, C. (2002) Perspectives on cadmium toxicity research. *Tohoku J Exp Med* 196, 23-32.
- Schafer, S.G., Schwegler, U. and Schumann, K. (1990) Retention of cadmium in cadmium-naïve normal and iron-deficient rats as well as in cadmium-induced iron-deficient animals. *Ecotoxicol Environ Saf* 20, 71-81.
- Terman, A. and Brunk, U.T. (2006) Oxidative stress, accumulation of biological 'garbage', and aging. *Antioxid Redox Signal* 8, 197-204.
- Waalkes, M.P. (2003) Cadmium carcinogenesis. *Mutat Res* 533, 107-120.
- Yaman, M., Kaya, G. and Simsek, M. (2007) Comparison of trace element concentrations in cancerous and noncancerous human endometrial and ovary tissues. *Int J Gynecol Cancer* 17, 220-228.

Table 1
Simplified hematological parameters of mice exposed to 0 and 200 ppm cadmium in drinking water.

	Control	200 ppm Cd
Red Blood cells ($10^6/\text{mm}^3$)	9.5 (0.5) ^a	10.5 (0.8)
Hemoglobin (g/dL)	15.5 (0.5)	16.7 (1.5)
Hematocrit (%)	43.4 (1.8)	47.8 (4.2)
mean corpuscular volume (μm^3)	45.8 (0.5)	45.7 (0.6)
Platelets ($10^3/\text{mm}^3$)	839 (189)	939 (59)
White blood cells ($10^3/\text{mm}^3$)	4.4 (1.7)	5.4 (1.2)

^a values given with the standard deviation (in brackets) calculated for four animals

Legends of Figures

Fig. 1. Iron distribution in cadmium contaminated mice. Separate groups of animals had access to 0-100-200 ppm CdCl_2 in drinking water for three weeks. The amount of iron in the organs is reported for intestines (open bars), liver (squared bars) and kidneys (black bars) in the top panel and for spleen in the bottom panel.

Fig. 2. Western blot detection of IRP1 in kidney and liver of mice exposed to cadmium. Top: Western blot analysis was performed with anti-human IRP1 and anti- β -actin antibodies using 50 μg of soluble proteins from the kidneys (left) or the liver (right) of two animals, one (0) kept under the control diet, the other (200) having access to 200 mg/L cadmium in the drinking water. Size markers are indicated on the right. The intensity of each band is plotted in arbitrary units relative to that of β -actin in the bottom histogram with open bars for kidneys and black bars for liver.

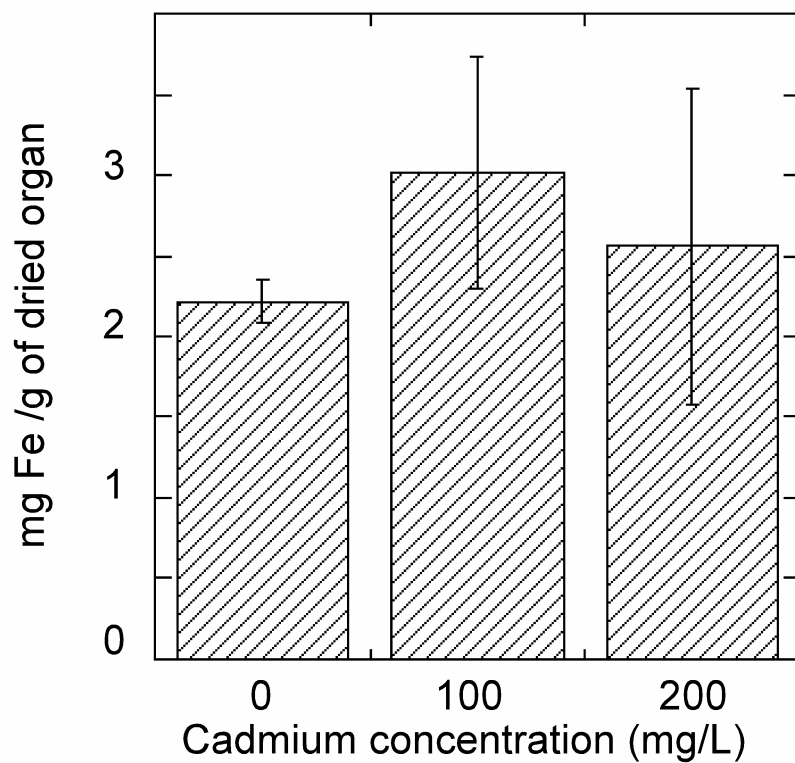
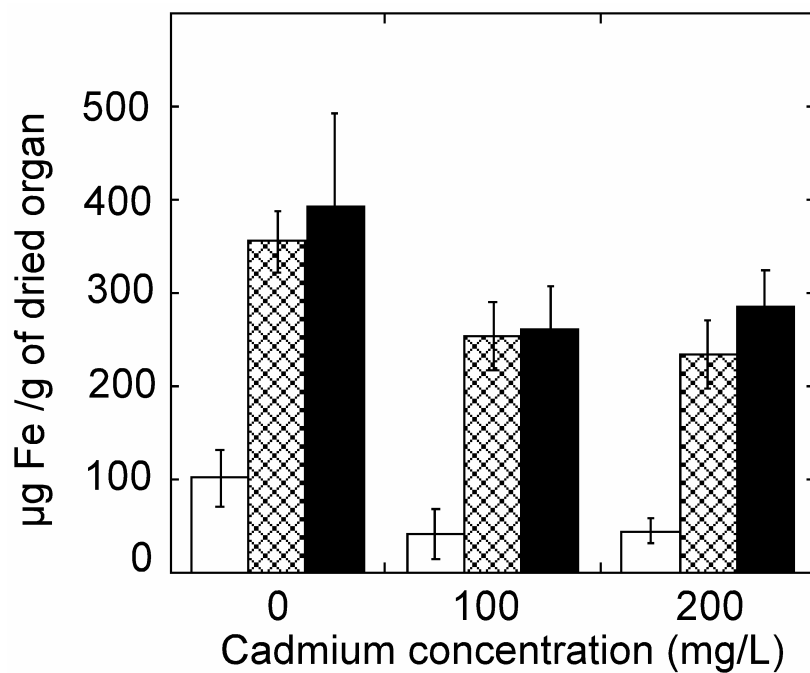
Fig. 3. IRE-binding activity in kidney and liver of mice exposed to cadmium. Top panels: Representative electrophoretic shift-assays of kidney and liver lysates of two animals, one (0) kept under the control diet, the other (200) having access to 200 mg/L cadmium in the drinking water. Each sample was analyzed twice, with (+) or without (-) addition of 2-mercaptoethanol (2ME). The positions of the IRE-IRP complex and of the non bound IRE probe are indicated on the right and recombinant human IRP1 was loaded on the left lane of the right panel for comparison; Bottom panel: the fraction of spontaneously active IRP was measured for the organs of each animal and the data are reported as a function of cadmium exposure for kidneys (open bars) and livers (black bars).

Fig. 4. Western blot detection of IRP1 in HeLa and HZR cells. Top panels: representative Western blots detecting IRP1 and β -actin in lysates after the indicated cadmium treatments. The lane labeled R contained purified recombinant human IRP1 (Brazzolotto et al., 1999). Bottom panels: cumulative data showing the ratio of the IRP1/ β -actin signals in arbitrary units from five different Western blot experiments. Left: HeLa data, right: HZR data. Data of all experiments were analyzed using Student's paired t test. *, $p < 0.03$; **, $p < 0.01$, compared with HeLa cells controls. No significance ($p > 0.1$) was found in the case of HZR cells.

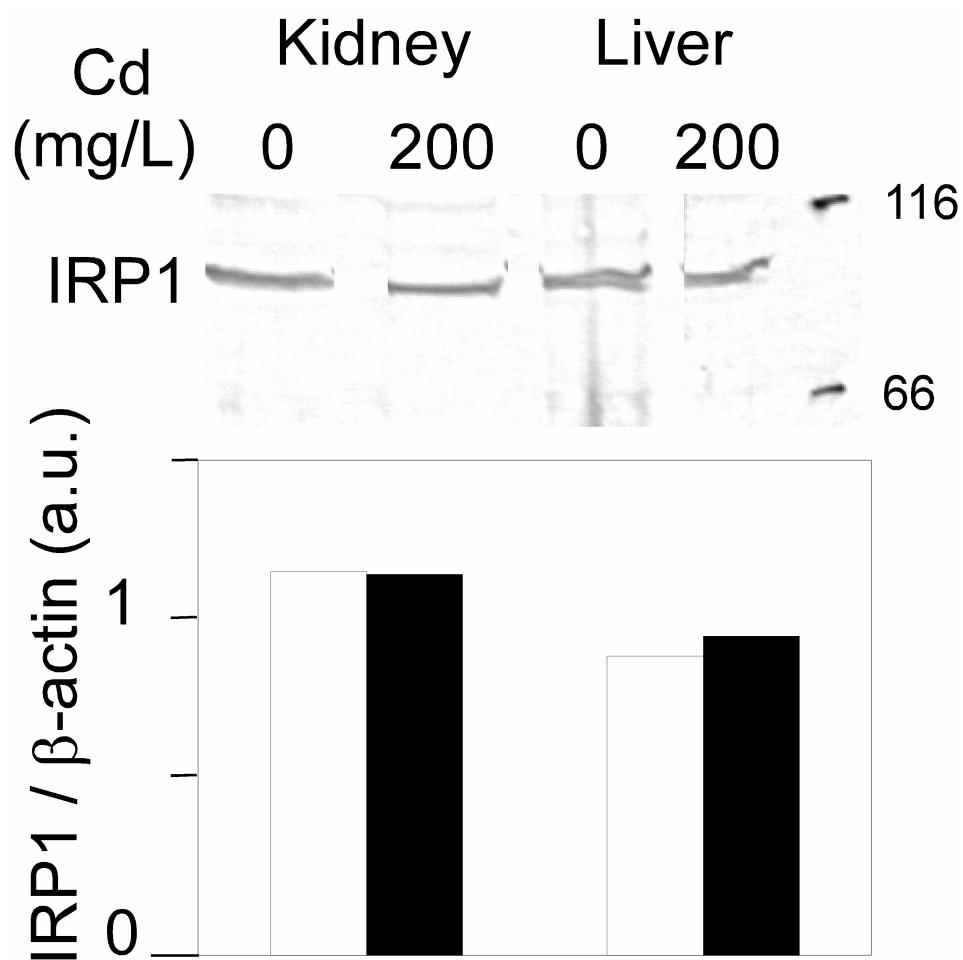
Fig. 5. IRE-binding activity in HeLa and HZR cells. (A) Representative electrophoretic shift-assays of lysates after different cell treatments with the indicated cadmium concentrations. Each sample was loaded twice, with (+) or without (-) addition of 2-mercaptoethanol (2ME). The positions of the IRE-IRP complex and of the unbound IRE probe are indicated on the right; (B) The fraction of spontaneously active IRP was measured from five different EMSA experiments for each condition, except for HZR cells at 7 μ M Cd for which a single value is plotted. None of the differences are significant. (C) The total amount of IRP as deduced from 2ME addition to the same assays is reported relative to that of parent cells not exposed to cadmium. Student's paired *t* test for HeLa cells, *, $p < 0.06$, **, $p < 0.003$, and for HZR cells $p > 0.1$ was applied for comparison with controls. In all panels, data for HeLa cells are on the left, those for HZR cells are on the right.

Fig. 6. Semi-quantitative measurements of the transferrin receptor transcript.

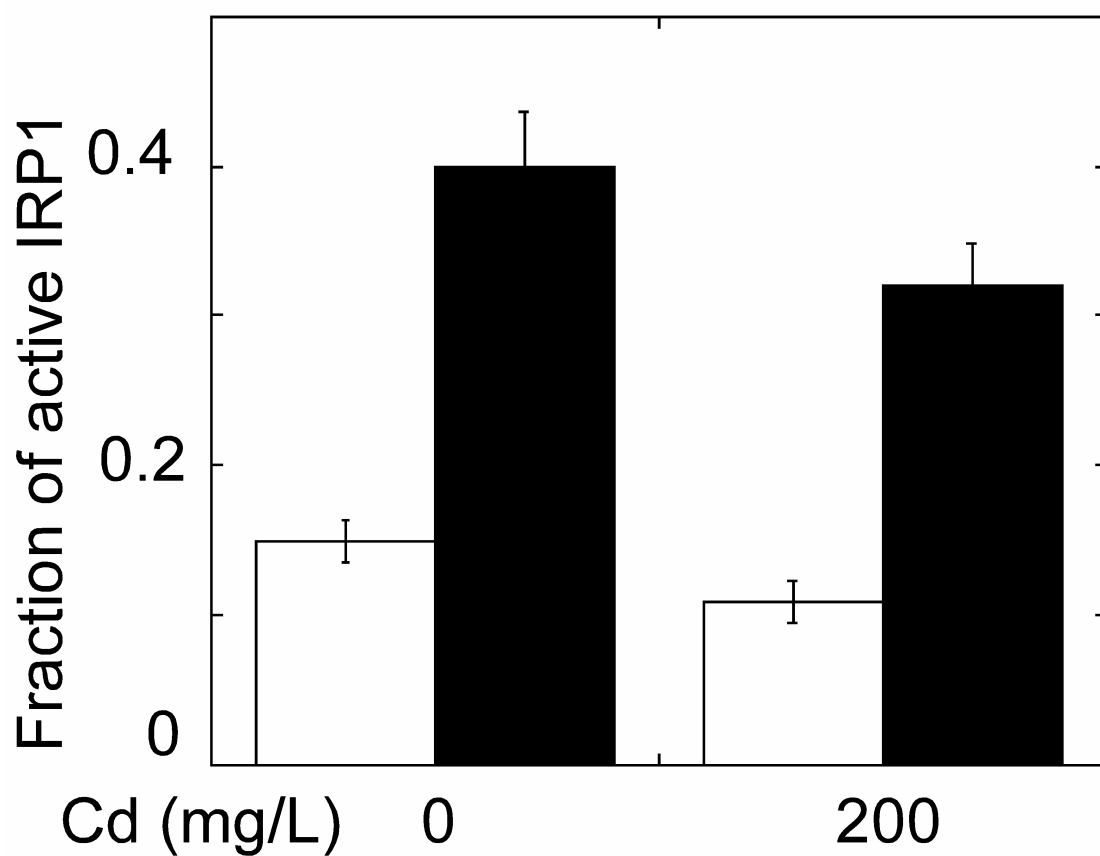
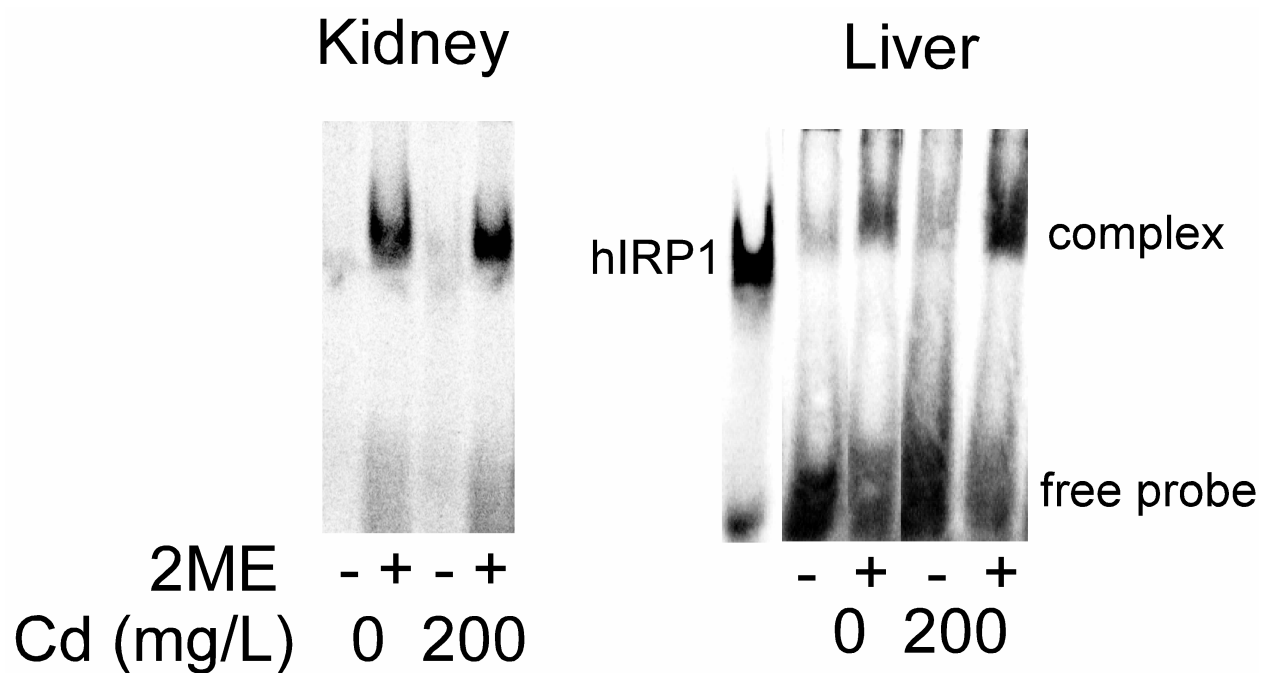
Reverse transcriptase - polymerase chain reaction experiments were carried out with total RNA purified from HeLa and HZR cells exposed to the indicated cadmium concentrations (gel on the top). The position of size markers in bp is indicated on the left scale. The ratio of intensity of bands in the linear amplification range is reported in the lower part of the Figure with reference to β -actin mRNA which was amplified from less cDNA template.



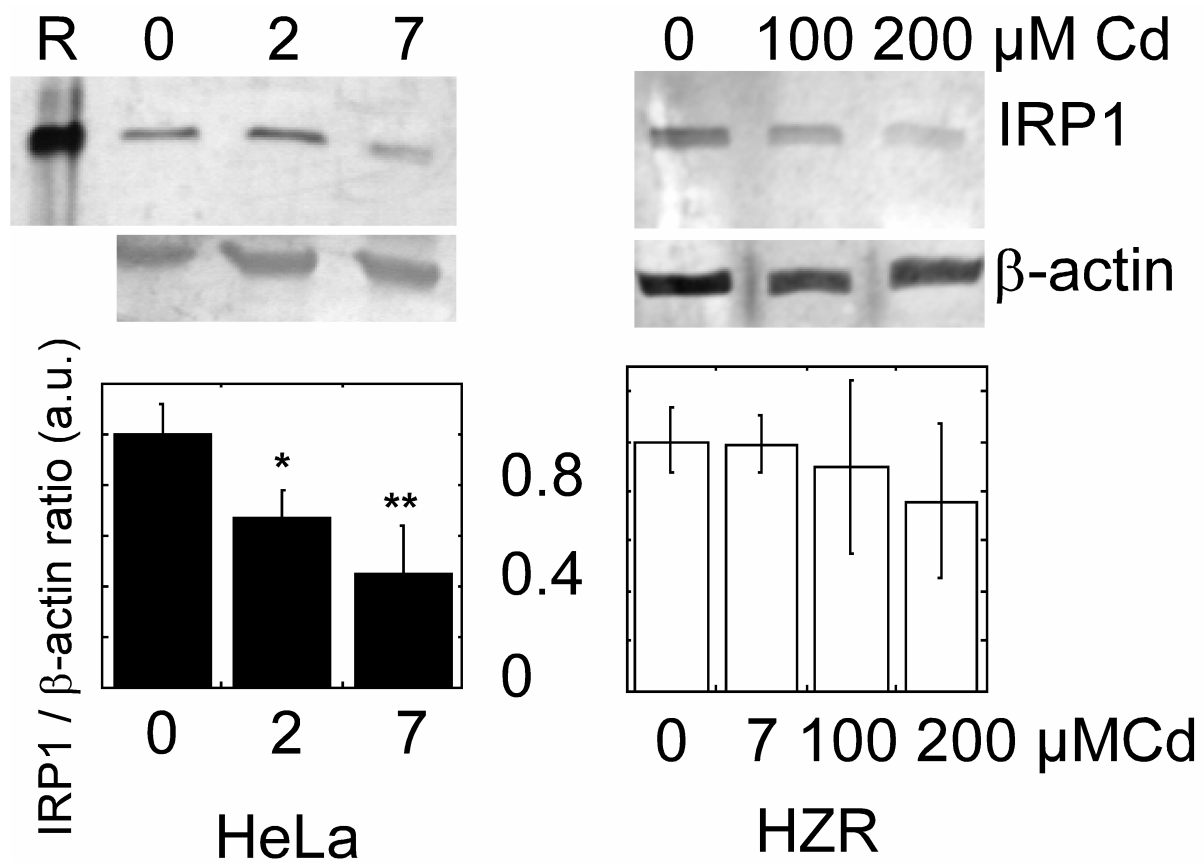
ROUSSELET & MOULIS, FIGURE 1



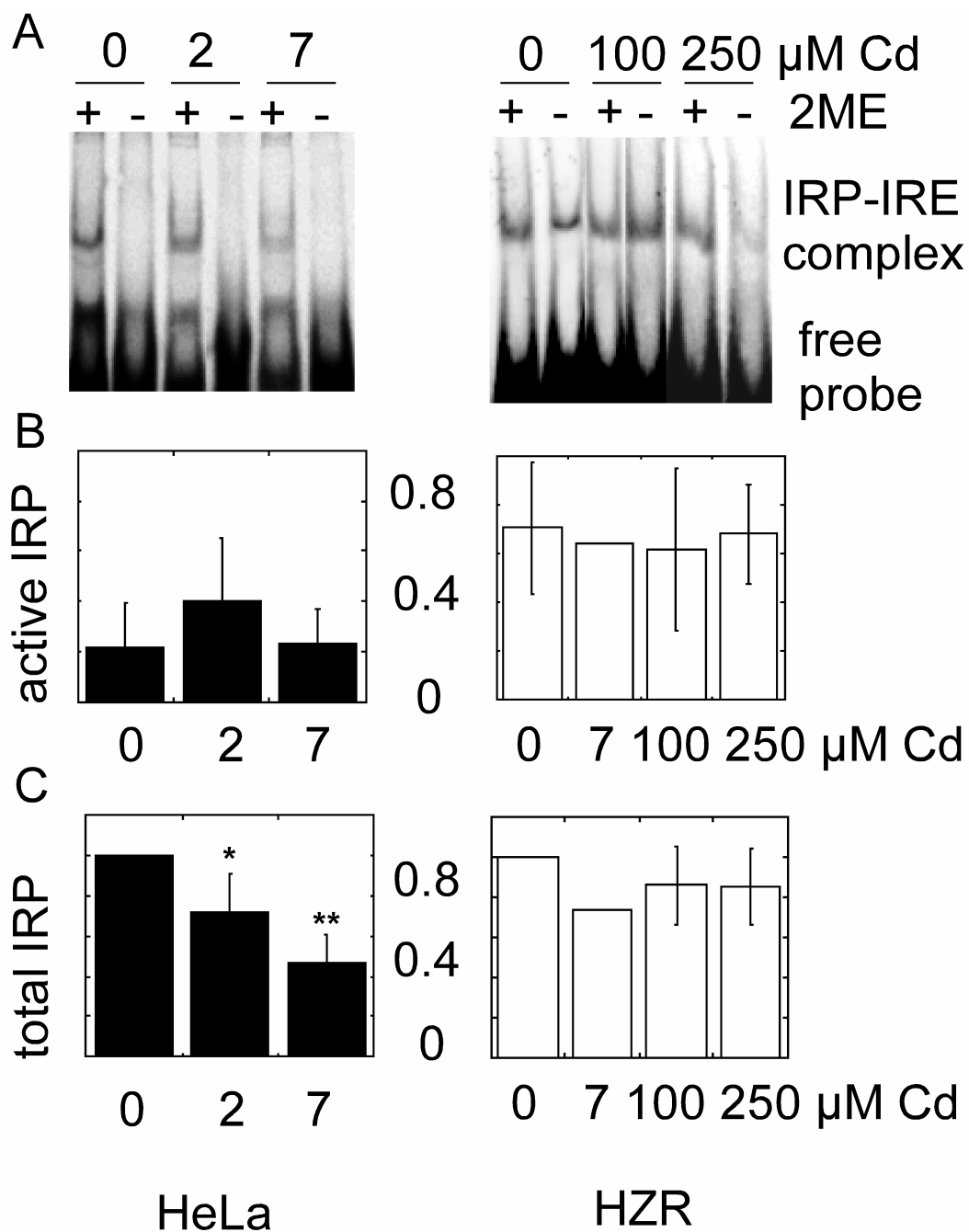
ROUSSELET & MOULIS, FIGURE 2



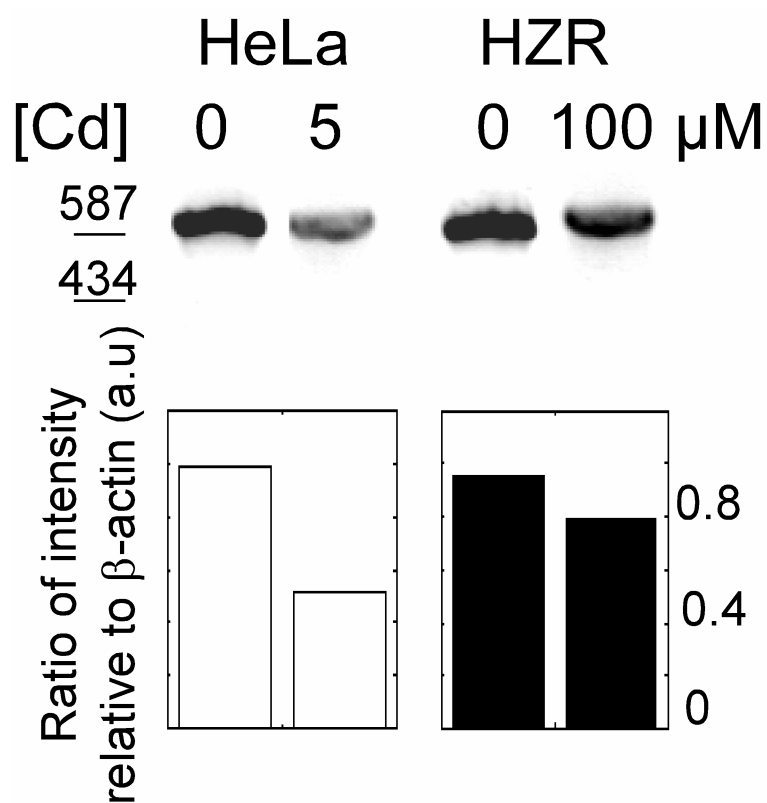
ROUSSELET & MOULIS, FIGURE 3



ROUSSELET & MOULIS, FIGURE 4



ROUSSELET & MOULIS, FIGURE 5



ROUSSELET & MOULIS, FIGURE 6

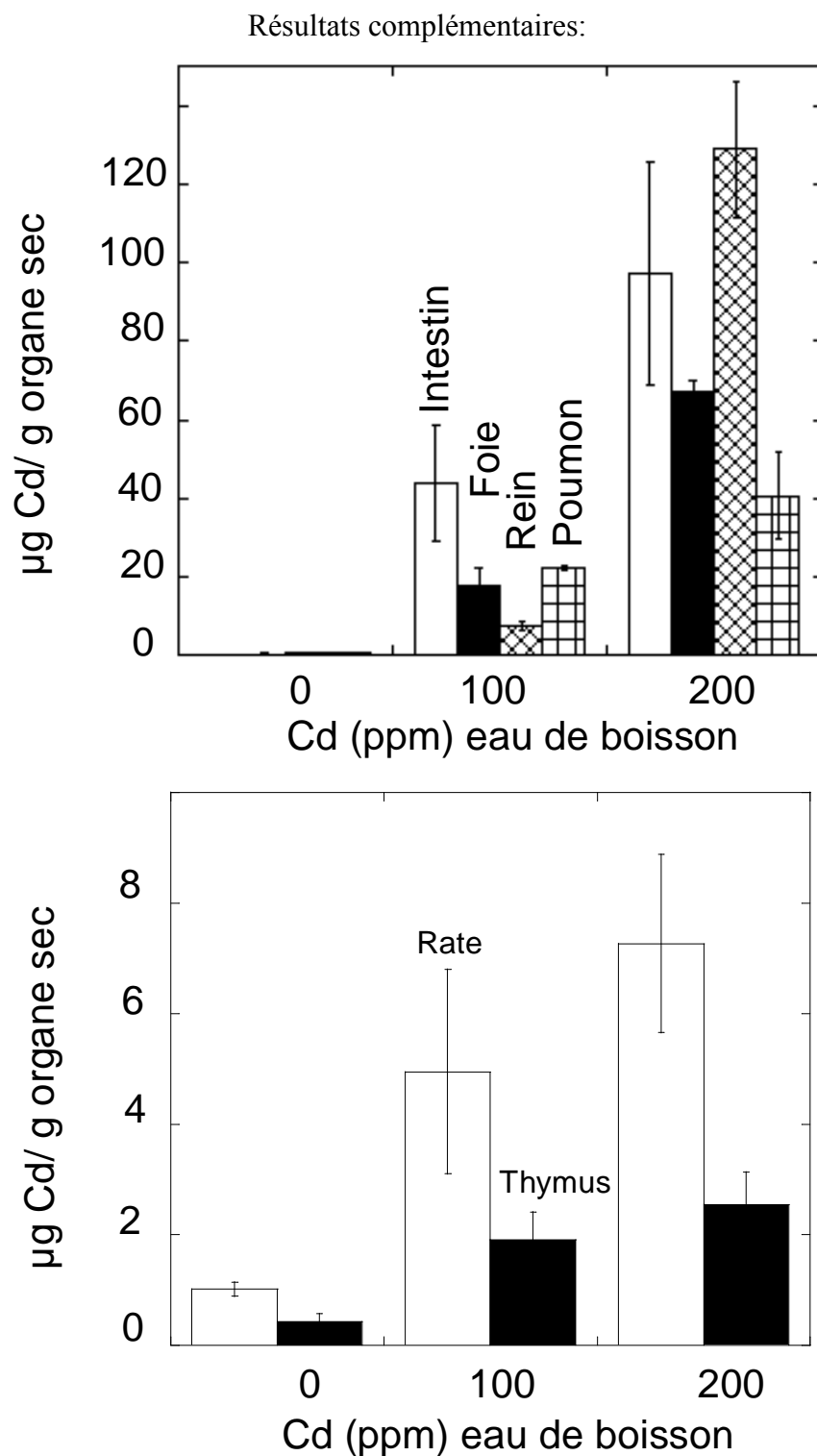


Figure II-2 : Dosage du cadmium dans divers organes de souris. Des groupes séparés d'animaux ont accès à 0, 100 ou 200 ppm de CdCl_2 dans l'eau de boisson durant trois semaines. La quantité totale de cadmium par unité de poids sec pour divers organes est reportée dans les intestins (panel du haut, blanc), le foie (panel du haut, noir), les reins (panel du haut, hachuré), les poumons (panel du haut, quadrillé) et également pour la rate (panel du bas, blanc) et le thymus (panel du bas, noir).

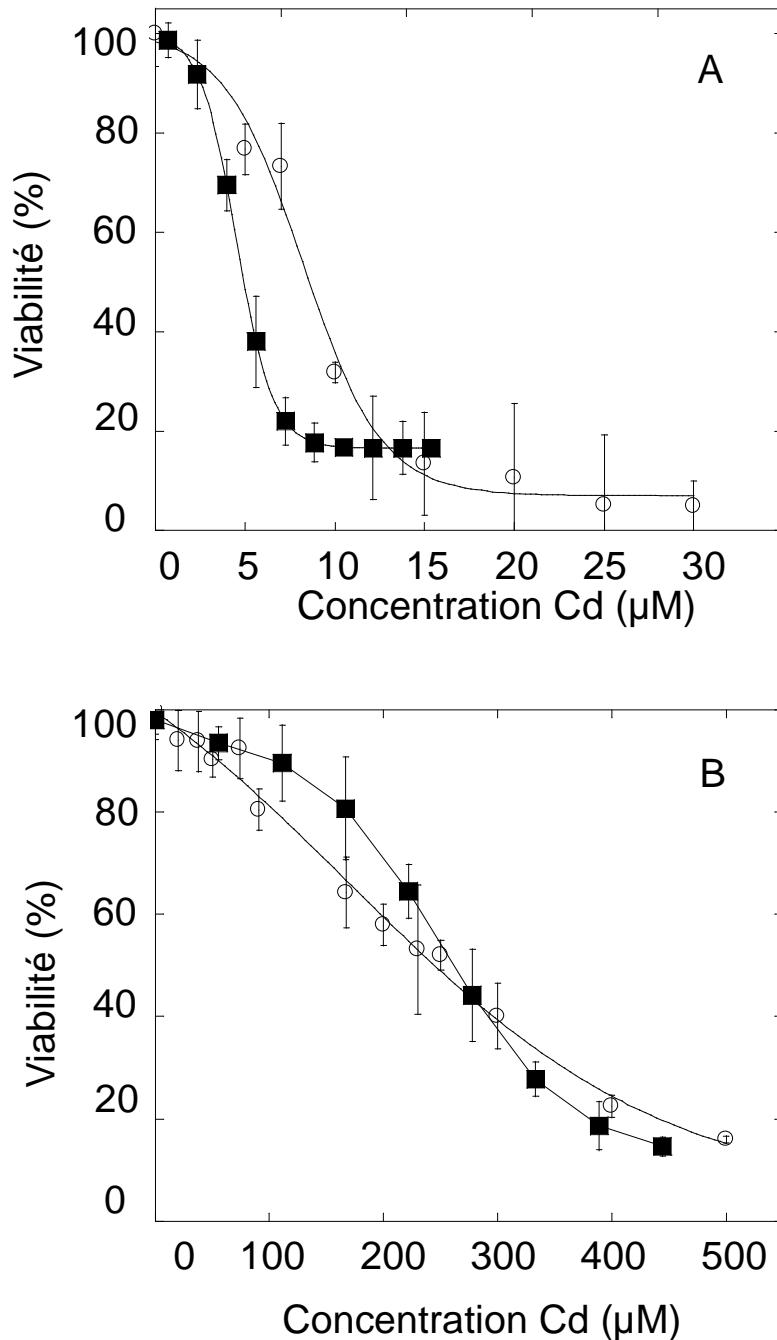


Figure II-3 : Effet de la desferrioxamine sur la viabilité des cellules vis-à-vis du cadmium. Les cellules HeLa (A) et High Zinc Resistant (B) ont été pré-incubées pendant quatre heures en présence de 200 μM de desferrioxamine (rond blanc) dans le milieu de culture ou non (carrés noirs) puis des concentrations croissantes d'acétate de cadmium ont été ajoutées pendant 24 heures. Pour les cellules HZR maintenues dans un milieu supplémenté de 200 μM d'acétate de zinc, celui-ci est remplacé par un milieu dépourvu de zinc pendant la durée de l'expérience. Les cellules viables sont mesurées par le test MTT. Les résultats sont reportés en pourcentage par rapport aux cellules viables non exposées au cadmium. La déviation standard pour chaque point est calculée pour des mesures effectuées en quadruplicat de deux expériences indépendantes. La CL_{50} est la concentration de cadmium pour laquelle 50% des cellules sont mortes.

II-4. Résultats et discussion

II-4.1 Comparaison entre les différentes études sur l'effet du cadmium et son interaction avec le fer *in vivo* et intérêt de notre étude.

Notre étude visait à étudier l'impact d'une exposition assez courte au cadmium sur le statut en fer des animaux, et non à provoquer d'abord un état d'anémie puis étudier ensuite l'impact de la toxicité du cadmium. Ces études nous montrent que le cadmium s'accumule dans la plupart des organes étudiés. Dans ces dernières conditions, des rats nourris avec une diète appauvrie en éléments zinc, calcium et fer pendant cinq semaines possèdent une absorption plus élevée de cadmium que ceux nourris normalement (Reeves and Chaney, 2001). Cela est le résultat d'une accumulation très importante (jusqu'à huit fois) du cadmium dans le duodénum par rapport aux animaux de référence. Il en résulte également l'accumulation de cadmium dans le foie et les reins des animaux (Reeves and Chaney, 2004). Des études montrent que la synthèse protéique de DMT-1 présent au niveau des entérocytes augmente en cas de déficience en fer (Bressler et al., 2004; Ryu et al., 2004) en rapport avec l'activation des IRP. Cela explique que l'absorption du cadmium soit influencée par le statut en fer (Introduction) et que des animaux anémiés présentent une accumulation importante de cadmium dans divers organes. Ceci est également vérifié chez des souris ayant une diète normale ou appauvrie en fer pendant 4 semaines et qui 15 heures avant d'être sacrifiées ont ingérées une dose massive de CdCl_2 . Les animaux ayant une diète contenant 20 fois moins de fer présentent une accumulation de cadmium trois fois plus importante, ainsi qu'une augmentation de l'expression des transcrits DMT-1 et de la ferroportine (Kim et al., 2006). La ferroportine est présente sur la surface basolatérale des entérocytes et permet le transport des ions ferreux dans la circulation sanguine.

Concernant, à l'inverse, les études réalisées sur des animaux nourris sans carence en fer, elles montrent que le cadmium possède également un impact sur la régulation du fer. Ainsi, une exposition chronique pendant laquelle 50 ppm de chlorure de cadmium sont en libre accès dans de l'eau de boisson pendant 12 semaines, induit une réduction de fer dans le sérum, le foie et la rate de rats Wistar, conséquence de la réduction de l'absorption de fer (Jurczuk et al., 2003). Cette réduction d'absorption a également été décrite lors de processus compétitifs d'absorptions entre le fer, en quantité faible ou normale, et le cadmium chez des

rats (Crowe and Morgan, 1997). Une exposition au cadmium présent dans l'eau de boisson, pendant 30 jours, entraîne chez les rats une anémie due à la séquestration des globules rouges dans la rate dont la quantité de fer double (Kostic et al., 1993). Des états anémiques engendrés par le cadmium chez des rats subissant une injection de cadmium sous-cutanée une fois par semaine pendant 6 à 9 mois, sont consécutifs à la perturbation de la production d'érythropoïétine (EPO) dans les reins qui ont subi des dommages. Par contre l'EPO plasmatique est inchangée (Horiguchi et al., 1996). Cela a aussi été mis en évidence in vitro, sur des lignées cellulaires hépatiques dans lesquelles le cadmium supprime l'activité fixatrice du facteur de transcription HIF-1 sur le motif HRE présent sur le gène de l'EPO (Introduction III-4b-d) et par conséquent l'expression de l'EPO (Horiguchi et al., 2000; Obara et al., 2003).

Au vu de ces études, nous nous sommes placés dans des conditions relativement similaires, c'est-à-dire que les concentrations de cadmium ainsi que la durée d'exposition semblent être suffisantes pour induire une augmentation de cadmium dans les organes cibles de ce métal (Figure II-2). En effet, l'intestin est l'organe responsable de l'absorption du cadmium, le foie est un organe de détoxification important, et enfin les reins. Les reins sont les organes responsables de l'excrétion urinaire de cadmium et semblent être l'une des cibles principales suite à des intoxications de cadmium par absorption (Introduction I). La rate accumule également le cadmium en moindre proportion, cependant cet organe joue un rôle vis-à-vis de l'homéostasie du fer car elle prend en charge la destruction d'une majeure partie des globules rouges sénescents. Le cadmium à la plus forte concentration a également engendré une forte augmentation du volume de la rate ainsi que des fèces liquides. On voit donc bien que le cadmium touche l'intégrité de certains organes et qu'il existe des effets sur l'animal. Cependant, la numération sanguine ne révèle aucune différence entre les animaux traités ou non au cadmium. A défaut de mesurer le fer sérique ainsi que le niveau de transferrine et ferritine pour lesquels nous n'avons pas eu accès à un appareillage adapté, nous avons choisi une autre approche, originale puisque jamais utilisé dans ce type d'étude, qui est l'utilisation d'un bio-marqueur de fer cellulaire : le système IRP/IRE.

L'étude de l'activité fixatrice des protéines IRP tissulaires s'est révélée être en accord avec la numération sanguine, à savoir que les souris ne montrent pas de carence en fer suite à l'absorption de cadmium. Nous aurions cependant dû effectuer les mesures d'activité des IRP dans les intestins, ce qui aurait pu nous renseigner sur la toxicité du cadmium dans cet organe. Toutefois, les intestins sont constitués de diverses parties regroupant le duodénum, le jéjunum et l'iléum, dont il aurait fallu isoler le duodénum. L'activité des IRP n'a pas pu être mesurée

car le traitement utilisé pour ce type d'organe, qui contient de nombreuses protéases, n'était pas approprié. Finalement, malgré une accumulation de cadmium dans certains organes, les conditions d'exposition au cadmium, c'est-à-dire une durée d'exposition relativement courte (3 semaines), n'ont pas révélé d'effets du cadmium sur l'homéostasie du fer. Ceci indique que la dérégulation de l'homéostasie du fer suite à une intoxication par le cadmium n'est pas un événement précoce du mécanisme de toxicité.

II-4.2 Interaction entre le cadmium et l'homéostasie du fer par comparaison entre les cellules épithéliales HeLa et les cellules résistantes au zinc.

Les cellules HZR sont issues des cellules HeLa et sont maintenues dans 200 μ M de zinc. Bien que les mesures d'IRP1 indiquent que ces deux lignées possèdent la même quantité de ce bio-marqueur dans ces conditions, nous avons mis en évidence quelques différences d'intérêt. En effet, les cellules HZR non stressées présentent une activité fixatrice d'IRE plus importante que dans les cellules HZR, ce qui peut être corroboré, en partie, par une sensibilité plus importante des cellules HZR en présence d'un stress oxydant, comme l'application du peroxyde d'hydrogène (Chimienti et al., 2001). En effet, les IRP peuvent être activées en conditions de stress oxydant (Mueller, 2005; Pantopoulos, 2004), ce qui semble être un état proche de la situation de base pour les cellules HZR.

Les autres différences importantes sont remarquées en présence de cadmium. Ce toxique ne modifie pas la proportion de protéine IRP active dans les cellules HeLa, par contre, la quantité totale de protéine IRP, et, plus précisément, de protéine IRP1 révélée par western blot diminue en corrélation avec l'augmentation de cadmium. Les concentrations en cadmium pour lesquelles la quantité totale de protéine IRP diminue sont en accord avec la perte de viabilité cellulaire. Il est probable que la forme fixatrice d'IRE soit la plus sensible vis-à-vis du cadmium et que la cellule réussisse à maintenir l'équilibre entre la forme aconitase et la forme fixatrice d'IRE. En effet, la diminution de la forme fixatrice d'IRE est en accord avec l'agrégation de cette forme en présence de cadmium et de zinc sur des expériences réalisées *in vitro* (Martelli, 2004). La dégradation de la protéine IRP1 sous l'influence du cadmium pourrait résulter d'une modification, suivie de sa dégradation par le système ubiquitine-protéasome (Wang et al., 2007). En effet, le cadmium est capable d'induire la phosphorylation de protéines intervenant dans les voies de signalisation (Waisberg et al., 2003)(Introduction III-5 f), de plus, la seule modification décrite d'IRP1, à l'exclusion de l'assemblage du centre

[4Fe-4S] correspond à une phosphorylation sur deux sites : les sérines 138 et 711 (Eisenstein et al., 1993; Fillebeen et al., 2005; Fillebeen et al., 2003). Les conséquences seraient alors une dégradation de la protéine par le protéasome suite à son ubiquitination. Cependant ce mécanisme envisagé n'a pas été exploré.

Dans les cellules HZR, au contraire, le stress cadmium ne modifie pas la quantité totale de la protéine. Il semble donc que, dans ces cellules, soit présent un mécanisme de protection de la protéine IRP1 inexistant dans les cellules HeLa.

II-4.3 Rôle d'un chélateur de fer : la desferrioxamine.

L'ajout de desferrioxamine était destiné à mettre en évidence une éventuelle toxicité accrue du cadmium sur des cellules sensibilisées en fer par l'ajout d'un chélateur. La présence de desferrioxamine dans le milieu de culture pendant 4h (Figure II-3, rond blanc), ne semble pas affecter la viabilité des cellules HeLa et HZR vis-à-vis du cadmium (Chapitre 1 article 1 Figure 1). En effet, la CL₅₀ des cellules HeLa après 24 heures d'exposition au cadmium semble même augmenter légèrement, à environ 9 µM et celle des cellules HZR est de 200 µM (Figure II-3). Ainsi il semblerait que la chélation du fer n'influe pas tellement sur le transport et par suite sur la toxicité du cadmium dans les cellules HeLa et HZR. Il existe chez les mammifères un transporteur des métaux divalents, DMT1 (*Divalent Metal Transporter 1*) qui possède plusieurs variants d'épissage (Hubert and Hentze, 2002). Certains de ces variants possèdent une séquence IRE dans la région 3' de l'ARNm et sont ainsi directement régulés par l'état en fer de la cellule et, dans les autres, la séquence IRE n'est pas présente. Dans les entérocytes, comme le modèle Caco 2, les formes de DMT1 contenant l'IRE sont impliquées dans l'acquisition du fer, mais aussi dans celle du cadmium (Bannon et al., 2003; Tallkvist et al., 2001). Lors d'une carence en fer, la traduction de ce transporteur est augmentée et donc la toxicité du cadmium également (Piasek et al., 2004). Dans les cellules HeLa, les variants d'épissage de DMT1 contenant la séquence IRE ne sont pas régulés par le fer (Hubert and Hentze, 2002). Ainsi, le mécanisme d'acquisition du fer impliquerait les récepteurs de la transferrine sur lesquels viennent se fixer les transferrines contenant le fer. Suite à l'endocytose, le fer est transporté vers le cytosol par les formes de DMT1 sans IRE. En cas de carence en fer la synthèse de récepteurs de la transferrine est augmentée. A cause de la complexité du milieu de culture utilisé, dont la présence de sérum, le degré de carence des

cellules en fer n'est que peu maîtrisé. Nous avons montré que l'ajout de cadmium sur des cellules sensibilisées en fer à l'aide d'un chélateur, n'induit aucun changement important sur la viabilité des cellules (Figure II-3). Cela signifie que la présence d'un chélateur du fer n'affecte pas la toxicité du cadmium.

Les différences entre la lignée résistante au zinc et la lignée parente ont été examinées à une échelle plus globale, telle qu'accessible par l'électrophorèse bi-dimensionnelle ou l'étude comparative des ARN messagers. La troisième partie du mémoire est donc constituée de l'étude protéomique réalisée sur ces deux lignées afin d'examiner quelles protéines contribuaient au phénotype de la lignée résistante au zinc.

Chapitre 3 : Examen de quelques aspects moléculaires contribuant au phénotype de la lignée HZR résistante au zinc et comparaison avec la lignée parente épithéliale HeLa.

Chapitre 3 : Examen de quelques aspects moléculaires contribuant au phénotype de la lignée HZR résistante au zinc et comparaison avec la lignée parente épithéliale HeLa.

L'objet des travaux présentés dans ce chapitre concerne l'étude protéomique des différences existant entre la lignée HZR et la lignée parente conduisant à des phénotypes distincts vis à vis de la résistance aux métaux zinc et cadmium. L'examen des protéines différant entre ces lignées a été mené par électrophorèse bi-dimensionnelle réalisée en conditions basales, c'est-à-dire en présence de 200 μ M de zinc dans le milieu de culture des cellules HZR. Parmi les protéines surproduites dans les cellules HZR, nous les avons organisées en trois groupes principaux. Le premier implique des protéines intervenant dans la réponse vis-à-vis d'un stress du réticulum endoplasmique (RE), le second est limité à l'ubiquitine et enfin le dernier candidat est l'enzyme 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygénase. Le rôle de ces protéines dans la résistance des cellules HZR vis-à-vis du cadmium a été testé par des études de cytotoxicité en présence de thapsigargine ou tunicamycine permettant d'induire un stress au niveau du RE (Introduction III-4), en présence de lactacystine ou de MG 132 qui sont des inhibiteurs du protéasome ou bien enfin en présence de 2-[2-nitro-4-(trifluorométhyl)benzoyl]-1,3-cyclohexanedione (NTBC), inhibiteur de la 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygénase. Les résultats de cette étude montrent que des conditions de stress du réticulum endoplasmique jouent un rôle important dans la résistance des cellules HZR contre le cadmium et que le système ubiquitine-protéasome est aussi impliqué mais pas différemment pour les deux lignées. Enfin, la surexpression de la 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygénase dans les cellules HZR est une caractéristique importante de ces cellules qui participe à leur résistance vis-à-vis du cadmium.

Cadmium resistance of mammalian cells by adaptation to zinc. Molecular insight by proteomic analysis.

Estelle Rousselet^{1,2,3}, Alain Martelli^{1,2,3,4}, Mireille Chevallet^{3,5,6}, Hélène Diemer⁷, Alain Van Dorsselaer⁷, Thierry Rabilloud^{3,5,6} and Jean-Marc Moulis^{1,2,3}

Affiliations:

¹ CEA, DSV, IRTSV, Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux, 17 rue des Martyrs, Grenoble, F-38054, France.

² LCBM, CNRS, Grenoble, France.

³ Université Joseph Fourier, Grenoble, France

⁴ present address: IGBMC, 1 rue Laurent Fries, BP 10142, 67404 Illkirch France

⁵ CEA, DSV, IRTSV, Laboratoire de Biochimie et Biophysique des Systèmes Intégrés; 38054 Grenoble Cedex 9; France

⁶ BBSI, CNRS, Grenoble, France

⁷ Laboratoire de Spectrométrie de Masse, CNRS UMR7178, Strasbourg, France

Abbreviations:

HZR: High Zinc Resistant HeLa cells; SERCA: Sarco-endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase; PBS: phosphate buffered saline; ER: endoplasmic reticulum; LC_{50} : lethal concentration for 50% of the cells; HSP: Heat Shock Proteins; UPR: Unfolded Protein Response; Hop: Hsp70/Hsp90 organizing protein; NTBC: 2-(2-Nitro-4-Trifluoromethyl-Benzoyl)-1,3-Cyclohexanedione; SD: Standard Deviation; ERAD: ER-associated protein degradation; MIF: macrophage migration inhibitory factor.

Correspondence:

* Jean-Marc Moulis, CEA-Grenoble, IRTSV/LCBM, 17 rue des martyrs, F-38054 Grenoble Cedex 9, France. Tel: (33) 4 38 78 56 23, e-mail: jean-marc.moulis@cea.fr

ABSTRACT

To identify proteins involved in cellular adaptive responses to zinc, we have carried out a comparative proteome analysis between a previously developed high zinc resistant human epithelial cell line (HZR) and the parental HeLa cell line. Differentially produced proteins included co-chaperones, proteins associated with oxido-reductase activities, and ubiquitin. As HZR cells are also highly resistant to cadmium, we have probed the involvement of biochemical pathways to which these proteins belong in the resistance against cadmium toxicity. Among endoplasmic reticulum stressors, thapsigargin sensitized HZR cells to cadmium toxicity more acutely than tunicamycin, implying that these cells heavily relied on proper intracellular calcium distribution. HeLa cells did not display changes under the same conditions. In contrast inhibitors of the proteasome such as MG-132 or lactacystin were equally efficient in decreasing cadmium resistance of both HeLa and HZR cells, excluding improved proteasome activity by increased ubiquitin as the mechanism responsible for the phenotypic differences between these cell lines. The enzyme 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase was overproduced in HZR cells as compared to HeLa cells. This enzyme is involved in the second step of tyrosine catabolism and converts 4-hydroxyphenylpyruvate to homogentisate. Inhibition of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase decreased the resistance of HZR cells against cadmium but not that of HeLa cells. The reported data suggest that zinc and cadmium resistance of HZR cells depends on conversion of 4-hydroxyphenylpyruvate into melanin derivatives or on cytokine production, or both.

229 words.

INTRODUCTION

Zinc is an essential metal as a component of a wide variety of zinc-finger proteins including transcription factors, metalloenzymes, and other proteins with various functions (Berg and Shi, 1996). However, large or improperly handled zinc concentrations in cells are toxic (Vallee and Falchuk, 1993). Consequently zinc homeostasis is precisely maintained (Cousins et al., 2006a). Zinc and cadmium share a range of physico-chemical properties, but it is not known whether their toxicity mechanisms are related or similar (Martelli et al., 2006).

Cadmium is well recognized as an industrial pollutant and a food contaminant which accumulates with a half-life of more than 10 years in the body due to poor organismal excretion mechanisms. Once inside cells, cadmium leads to a diverse and complex series of events that may culminate with cell death. To attenuate cadmium toxicity, cells respond by modulating the expression levels or activities of proteins. These include numerous proteins that (i) sequester cadmium, such as metallothioneins (MT), to prevent its interaction with sensitive cellular targets; (ii) increase GSH synthesis and detoxify reactive oxygen species that are generated by cadmium; (iii) repair damage to cellular components such as DNA; and (iv) help folding or degrade unfolded proteins (Beyersmann and Hechtenberg, 1997). In response to the ER stress that is induced by impairment of protein folding, cells activate a pathway known as the unfolded protein response (UPR) (Rutkowski and Kaufman, 2004). The UPR is a complex mechanism that includes increased synthesis of HSP acting as mediators of protein folding to maintain or recover their activity.

Another mechanism that contributes to maintain cellular homeostasis is the elimination of unfolded proteins through the energy-dependent, ubiquitin-proteasome degradation pathway (Meusser et al., 2005). This pathway involves two steps. First, the target protein is conjugated with ubiquitin molecules at lysine residues. Then, the ubiquitin-tagged substrate is transferred to the 26S proteasome, a multisubunit complex consisting of a 20S barrel-shaped proteolytic core and a 19S cap-like regulatory complex.

A human epithelial cell line derived from HeLa cells by increased resistance to zinc, called HZR (Chimienti et al., 2001), has been developed. This cell line has also been shown to sustain high cadmium concentrations for 24 hours ($LC_{50}=250\text{ }\mu\text{M}$), in contrast to parental HeLa cells that are rapidly killed by a few μM of the toxic metal (Rousselet et al. unpublished). Therefore, the HZR cell line provides a convenient model to study mechanisms of resistance to exposure to heavy metals such as zinc and cadmium.

A candid approach to gain insight into the differences between HZR and HeLa cells has been implemented by obtaining high resolution electrophoretic 2D gels of total cellular extracts. The differences between the two proteomes were unexpectedly small and the proteins that differed between the two cell lines pointed to some of the above listed biological functions previously shown to be perturbed by cadmium. These functions have been probed by use of specific inhibitors and the obtained results show that the resistance mechanisms cannot be simply ascribed to some increased activity. Rather, detailed analysis of the suggested pathways indicates a likely important role for signaling pathways, as indicated by the sensitivity of resistant cells to calcium homeostasis. In addition, these studies also reveal the importance of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase, an enzyme of the tyrosine catabolic pathway, in the adaptation to zinc and the resistance against cadmium. Increased tyrosine turnover may not explain the observed phenotype and alternative possibilities are proposed.

MATERIALS AND METHODS

Cell Culture

Epithelial human cervix carcinoma HeLa cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) with 2 mM L-glutamine and 5% heat-inactivated fetal bovine serum at 37°C with a gas mixture of 5% CO₂ and 95% air. High Zinc Resistant cells (Chimienti et al., 2001) were routinely grown as HeLa cells in the same medium supplemented with 200 µM zinc acetate.

Preparation of cell lysate:

HeLa and HZR cells (40×10^6) were harvested by centrifugation, rinsed three times in 1 mL phosphate-buffered saline and pellets were resuspended in homogenisation buffer (0.25 M sucrose, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA). A buffer volume approximately equal to the packed cell volume was used. The suspension was transferred to a polyallomer ultracentrifuge tube, and the cells were lysed by the addition of 4 volumes (relative to the suspension volume) of 8.75 M urea, 2.5 M thiourea, 25 mM spermine, and 50 mM dithiothreitol. After 1 h at room temperature, the extracts were centrifuged (30 min at 200,000 x g). The supernatant was collected and the protein content was determined by the Bio-Rad protein assay using bovine serum albumin as a standard. A total of 500 µg of proteins were diluted in 1 mL

rehydration buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 0.4% ampholytes, 20 mM DTT). The protein extracts were stored at -20°C .

Two-dimensional Electrophoresis:

The data reported herein were obtained with samples prepared from at least two independent cultures of each cell line. For a given lysate obtained as described above, at least two gels were prepared, one to localize differentially produced spots between the two cell lines by silver staining and a second to confirm the first by visualizing with a mass spectrometry-compatible stain, and to extract proteins of interest.

The first dimension of electrophoresis was performed with immobilized pH gradients for isoelectric focusing. Non linear 4–8 and zoom 5.5–7.5 pH gradients were used. Homemade pH gradient plates were cast and cut into 4-mm-wide strips (Gorg et al., 1998; Rabilloud et al., 1994). The samples were applied onto the strips by in-gel rehydration overnight using a thiourea-urea mixture as denaturing agent (Rabilloud et al., 1997). Isoelectric focusing was carried out for 60,000 Vh at a maximum of 3000 V using the MultiphorII system (Amersham-Pharmacia, Sweden). Strips were then equilibrated for 20 min first in 0.15 M bisTris/0.1 M HCl, 6 M urea, 2.5% SDS, 30% glycerol, 0.5 M DTT and then in 0.15 M bisTris/0.1 M HCl, 6 M urea, 2.5% SDS, 30% glycerol, 0.3 M iodoacetamide. Strips were placed on top of a SDS-acrylamide gel. After migration, the gels were stained either with silver (Sinha et al., 2001), or with colloidal Coomassie Blue when protein identification was sought (Neuhoff et al., 1988).

In Gel Digestion:

Excising gel slices, rinsing, and reduction/alkylation steps were performed with MassPREP station (Micromass, Manchester, UK) as described previously (Wagner et al., 2002). Gel pieces were completely vacuum-dried before digestion. Three volumes of freshly diluted 12.5 ng/ μl trypsin (Promega, Madison, WI) in 25 mM NH_4HCO_3 were added to the volume of the dried gel. Digestion was performed at 35°C overnight. Then, the samples were again vacuum-dried for 5 min and 5 μl of 35% H_2O /60% acetonitrile/5% HCOOH were added to extract peptides. The mixture was sonicated for 5 min and centrifuged for 5 min. The supernatant was recovered and the procedure was repeated once with the pellet.

MALDI-TOF-MS Analysis:

Mass measurements were carried out on an UltraflexTM MALDI-TOF/TOF spectrometer (Bruker-Daltonik GmbH, Bremen, Germany). The instrument was used at a maximum accelerating potential of 20 kV and was operated in reflector-positive mode. Sample preparation was performed with the dried droplet method using a mixture of 0.5 µl of sample with 0.5 µl of matrix solution. The matrix solution was prepared from a saturated solution of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid in H₂O/50% acetonitrile diluted 3 times in water. Internal calibration was performed with tryptic peptides resulting from autodigestion of trypsin (monoisotopic masses at $m/z = 842.5$; $m/z = 1045.6$; and $m/z = 2211.1$).

MS Data Analysis:

Monoisotopic peptide masses were assigned and used for databases searches using the search engine MASCOT (Matrix Science, London, UK) (Perkin, DN, 1999, Electrophoresis 20, 355). All human proteins present in Swiss-Prot were used without any pI and M_r restrictions. The peptide mass error was limited to 70 ppm, one possible missed cleavage was accepted.

MTT cell viability assay

The cytotoxicity of cadmium acetate, in addition to different drugs, on HeLa and HZR cells was determined after 24 h exposure by a modified MTT (3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide) method (Carmichael et al., 1987). Three thousand cells in 100 µl of growth medium were plated in 96-well plates and incubated for 24 hours before probing with a mix of cadmium acetate and different drugs. MTT, Lactacystin; Thapsigargin; and Tunicamycin were obtained from Sigma Chemical Co (St Louis, Mo, USA). NTBC was a kind gift of Dr David King (Swedish Orphan International AB, Stockholm, Sweden): stock solutions were prepared in ethanol and diluted in the medium to a maximum of 0.1 % ethanol. Viability was measured 24 hours later: ten µl of 5 mg/ml MTT were added in each well and the cells were incubated at 37°C for 3 h. Viable cells convert the soluble yellow MTT to insoluble purple formazan by the action of mitochondrial dehydrogenases. The medium was then removed, and the precipitate was dissolved in 100 µl of DMSO. The optical density was measured at 560 nm with a microplate reader (Multiskan, Labsystem RC). The percentage of viable cells (%) was calculated as follows: $\% = [(A-B)/(C-B)] \times 100$ where A = OD₅₆₀ of the treated sample, B = OD₅₆₀ of the background absorbance, and C = OD₅₆₀ of the reference cells

not exposed to the chemical compound being tested. Background absorbance was estimated by lysing a row of reference cells with 1% Triton X-100 before applying MTT.

Quantitative RT-PCR: Table 1

Complementary DNA was subjected to amplification by Q-PCR so that the amount of product was proportional to that of template. RNA extractions were carried out with the total Quick RNATM kit (Talent s.r.l., Trieste, Italy) according to the manufacturer's instructions. Total RNA (1.4 µg) was reverse transcribed by the RevertAidTM H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania) at 42°C for one hour using a poly-T primer. Real-time PCR was performed on total RNA preparations using a Stratagene Mx3005P instrument (Stratagene) as follows: the reaction mixture consisted of 12.5 µl of Full Velocity SYBR Green QPCR Master Mix (Stratagene), 140 nM of HPPD primer and 5µl of 12.5 ng cDNA adjusted to 25 µl with water. Initial denaturation was at 95°C for 5 min, followed by amplification for 40 PCR-cycles at 95°C for 10 s and at 60°C for 30 s successively. PCR fluorescent signals were normalized to the fluorescent signal obtained from the housekeeping genes *ribosomal phosphoprotein PO (RPLPo2)*, *β-actin* and *GAPDH* for each sample.

Statistical analysis

Experimental results of viability measurements were assessed with Student t-tests for unpaired data sets with unequal variance.

RESULTS

Comparative Proteome analysis of HeLa and HZR cells.

To better understand the mechanisms responsible for zinc resistance of HZR cells as compared to parental HeLa cells, two-dimensional gel electrophoresis has been implemented for both cell lines under usual culture conditions (Figure 1). Lysates of four different cultures of each cell line were analyzed. The general pattern displayed by the gels obtained with the two cell lines is quite similar, despite the addition of 200 μ M zinc to the medium used to grow HZR cells (Figure 1). This indicates that such gels are highly reproducible and that only few proteins have changed intensities or positions between the two cell lines. Therefore these differences are probably not due to a general and massive effect of zinc overload in HZR cells, and they are likely to give insight into the mechanism responsible for the phenotype of HZR cells. More detailed data were obtained with pI gradients between 5.5 and 7.5. Figure 2 shows silver staining of representative gels obtained after separation of 500 μ g of protein samples from HeLa and HZR cells, respectively. Spots of different intensities or absent in one of the two gels were excised and subjected to trypsin digestion, MALDI-TOF mass spectra measurements, and data base searching. Table 2 summarizes the proteins, the concentration or position of which change between HeLa and HZR cells. This list includes a co-chaperone (stress induced phosphoprotein-1), enzymes or subunits involved in oxidoreductase activities (thioredoxin reductase, flavoprotein subunit of succinate dehydrogenase, 4-hydroxyphenyl-pyruvate dioxygenase), and carbonic anhydrase II.

As Chimienti *et al.* (Chimienti et al., 2001) previously pointed out, metallothionein largely contributes to zinc adaptation of HZR cells. In an attempt to visualize metallothionein upregulation by two-dimensional gel electrophoresis, higher concentration gels were applied in the second dimension. Two spots of apparent 6.5 kDa mass were detected. The protein labeled M1 is of higher intensity in gels of HZR extracts than in those of HeLa cells (Figure 3) but its pI is lower than expected for metallothionein. Indeed, identification with mass spectrometry revealed that M1 did not correspond to metallothionein but to ubiquitin. M2 is the ubiquitin-like molecule NEDD8, the function of which includes regulation of the cell cycle, but its intensity is weak and it does not vary between the two cell lines under study (Figure 3).

The role of the identified proteins modified between HeLa and HZR cells in contributing to the cellular response to cadmium stress has been probed in the following.

Endoplasmic reticulum (ER) stress and sensitivity to cadmium toxicity.

Stress-induced phosphoprotein 1 (Hop) is a 60-kDa co-chaperone that mediates the association of the heat shock proteins Hsp70 and Hsp90 (Chen and Smith, 1998). The function of Hop has been best characterized in *in vitro* systems examining the assembly of the progesterone receptor (Kosano et al., 1998) and glucocorticoid receptor (Dittmar and Pratt, 1997) into hormone-binding competent heterocomplexes (Kimmins and MacRae, 2000). In previous investigations, cadmium has been reported to interfere with protein folding, leading to accumulation of misfolded proteins in endoplasmic reticulum (ER) (Cousins et al., 2006a; Liu et al., 2006). To estimate the endoplasmic reticulum stress that cells studied herein may experience under cadmium exposure, two different drugs were applied in addition to the toxic metal. The sesquiterpene lactone thapsigargin inhibits SERCA and consequently depletes the intracellular calcium stores (Inesi et al., 2005) and tunicamycin inhibits N-acetylglucosamine transferases, so preventing glycosylation of newly synthesized glycoproteins.

Viability tests were performed with the MTT assay in the presence of cadmium acetate for HeLa and HZR cells with 50nM of thapsigargin or tunicamycin. These concentrations of inhibitors were chosen because they minimally decrease the cells viability to the same extent (less than ca. 20%) for both cell lines. After 24h-exposure, the half-maximal lethal concentrations were about 7 μ M of cadmium for HeLa cells exposed to 50 nM thapsigargin or 50 nM tunicamycin (Figure 4A). These values are not significantly different than those measured in the absence of thapsigargin or tunicamycin, indicating that these concentrations of ER stressors do not sensitize HeLa cells to the cadmium insult.

In the case of HZR cells, replacement of the 200 μ M zinc acetate by varying cadmium concentrations for 24h and using the same concentration of thapsigargin as for HeLa cells indicated that these cells were far more sensitive to cadmium than without thapsigargin (Figure 4B). Cadmium half-maximal lethal dose measured after 24 hours of exposure was 25 μ M with 50 nM thapsigargin. This value is ten times smaller than in the absence of thapsigargin. Exposure of HZR cells to 50 nM tunicamycin (Figure 4B) led to a cadmium half-maximal lethal dose of 165 μ M which corresponds to a decrease of the resistance of HZR cells against cadmium. However, this sensitivity in the presence of tunicamycin does not increase as acutely as in the presence of thapsigargin. Therefore, inhibition of SERCA by thapsigargin and subsequent disruption of calcium homeostasis appears as a more potent stress that enhances cadmium toxicity than inhibition of glycosylation. These experiments

indicate that increasing ER stress decreases cadmium resistance toward cadmium, in a very sensitive way for HZR cells treated with thapsigargin.

Proteasomal degradation and sensitivity to cadmium toxicity.

As shown in Figure 3, ubiquitin was found to be up-regulated in HZR cells maintained in 200 μ M zinc. Although ubiquitin fulfills widespread cellular functions (Herrmann et al., 2007), labeling of misfolded proteins for removal by the proteasome is one of the major role of this small protein (Meusser et al., 2005). Upregulation of ubiquitin in HZR cells under standard conditions, i.e. with 200 μ M zinc, may reveal enhanced protein turnover through the proteasome pathway.

To examine whether increased degradation by the proteasome occurred in HZR cells, this pathway was inhibited by lactacystin (Fenteany and Schreiber, 1998). Viability tests implementing the MTT assay were carried out for HeLa and HZR cells with increasing concentrations of lactacystin for 24 hours (Figure 5A). A proteasomal inhibitor concentration (2.5 μ M) leaving about 80% of the cells under study viable after 24h of exposure was chosen in the following experiments. Half-maximal lethal concentration after 24h-exposure to cadmium and 2.5 μ M lactacystin was 3 μ M for HeLa cells (Figure 5B), as compared to 7 μ M for cells exposed to cadmium alone (p value <0.001). In the case of HZR cells, the cadmium half-maximal lethal dose was 75 μ M after 24 hours of exposure to 2.5 μ M lactacystine (Figure 5C). As in the case of HeLa cells, this value is significantly smaller (p value <0.001) than that measured in the absence of lactacystin. Qualitatively similar results were obtained by replacing the proteasomal irreversible inhibitor lactacystin by the reversible inhibitor MG132. These data highlight the involvement of the ubiquitin-proteasome pathway in the cellular response against cadmium toxicity in both HeLa and HZR cells.

Is 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase activity involved in zinc adaptation and cadmium resistance of HZR cells?

Effect of NTBC on cadmium toxicity

The 2D-electrophoretic data revealed the up-regulation of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (HPPD) in HZR cells as compared to HeLa cells (Figures 1 and 2). HPPD has an iron and 2-oxo-glutarate dependant enzyme in the catabolism of tyrosine. It catalyzes the complex conversion, including hydroxylation, decarboxylation and rearrangement steps, of 4-

hydroxyphenylpyruvate, the product of tyrosine aminotransferase, to homogentisate (Nakai et al., 1975; Purpero and Moran, 2006).

As the HPPD protein is over-produced in HZR cells, we have evaluated expression of its gene in both cell lines. For this purpose, relative levels of HPPD transcripts were measured by RT-PCR under standard growth conditions and compared to three different housekeeping genes. Expression of the HPPD gene was found to be about five times higher in HZR than in HeLa cells (Figure 6). Therefore HPPD overproduction in HZR cells occurs at least partly by increased transcription or mRNA stabilization as compared to HeLa cells. The increased concentration of HPPD in HZR cells does not seem to be triggered by the high zinc concentration in which these cells are maintained: indeed, HeLa cells exposed to zinc before analysis by 2D-electrophoresis did not display higher HPPD concentrations than HeLa cells kept in a medium with a normal zinc concentration. However, the reversibility of the HZR phenotype was mirrored by the decrease of HPPD in HZR cells kept without excess of zinc for 3 days. Therefore, increased HPPD is associated with the HZR properties, including resistance to both high zinc and cadmium concentrations, rather than to upregulation induced by short-term exposure to zinc.

In order to know if 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase activity contributes to cadmium management in the presently studied cells, a specific inhibitor of the enzyme, 2-nitro-4-(trifluoromethyl) benzoyl-1,3-cyclohexanedione (NTBC) was used (Kavana and Moran, 2003; Lindstedt et al., 1992). HeLa and HZR cells were treated with different concentrations of NTBC for 24 hours. Up to 300 μ M of NTBC, the viability, as determined with the MTT assay, slowly decreased in a similar dose-dependant way for both cell lines (Figure 7A). The NTBC concentration of 5 μ M minimally affected viability. It was added to cadmium acetate for 24 hours to measure the effect of the inhibitor on the cellular sensitivity to cadmium. For HeLa cells (Figure 7B), the half-maximal lethal cadmium concentration was unchanged in the presence of NTBC as compared to HeLa cells without NTBC (p value between data sets with and without the inhibitor= 0.63), whereas for HZR cells, LC_{50} was 90 μ M of cadmium in the presence of 5 μ M NTBC (Figure 7C). Therefore HeLa cells did not seem to be more sensitive to cadmium in the presence of NTBC, but viability of HZR cells decreased by about three fold in these conditions (Figure 7C). The shifts of HZR LC_{50} in the presence of NTBC varied with the concentration of the inhibitor, thus showing that NTBC affects resistance of HZR cells against cadmium in a dose-dependent way.

Sensitivity of HZR cells to combined NTBC and cadmium doses after long-term zinc removal.

The above experiments were carried out by cadmium substitution of zinc in the HZR growth medium for 24 hours. However the zinc and cadmium resistance phenotype of HZR cells is reversible upon zinc withdrawal (Chimienti et al., 2001). When zinc is removed from the growth medium for one week, not only the resistance against zinc decreases (Chimienti et al., 2001), but also the resistance against cadmium collapses to reach a LC_{50} of 40 μ M for 24-hours of exposure to cadmium. These zinc-depleted HZR cells were also treated with 5 μ M and 10 μ M NTBC in addition to cadmium for 24 hours. Viabilities obtained were similar for all these conditions giving LC_{50} values of 40 μ M on average. Therefore resistance against cadmium toxicity of zinc-depleted HZR cells was greatly decreased as compared to zinc-maintained HZR cells, and NTBC no longer had any effect on the half-maximal lethal cadmium concentration after zinc removal. These experiments demonstrate that the HZR phenotype of cadmium resistance depends on HPPD activity. It is significantly decreased when this activity is inhibited (Figure 7) and phenotypic reversal by zinc removal makes these cells insensitive to HPPD inhibition.

Effect of adding tyrosine on cadmium toxicity.

The tyrosine degradation product, 4-hydroxyphenylpyruvate (HPP), is converted by HPPD to homogentisate (Neve et al., 2003). Since HZR cells over-produce HPPD, tyrosine catabolism may be more active in these cells than in HeLa cells. Addition of tyrosine for 24 hours is not toxic for both cell lines up to 6 mM (not shown). The growth medium of HeLa and HZR cells, which already contains about 230 μ M of this amino acid, was supplemented with sub-lethal 3 mM of L-tyrosine. Viability curves were obtained for HeLa and HZR cells under these conditions with increasing cadmium concentrations. They show a decrease of LC_{50} with 3 mM L-tyrosine, which goes down to 5 μ M for HeLa cells (Figure 8A) and 145 μ M for HZR cells (Figure 8B), instead of 7 μ M and 250 μ M, respectively, for cells exposed to cadmium alone (Figure 8). Therefore, the burden of cadmium challenge is increased by the presence of sub-lethal tyrosine concentrations for both cell lines. The combined effect of NTBC and tyrosine on the sensitivity toward increasing cadmium concentration was also determined. The LC_{50} obtained for HeLa cells in the presence of 3 mM tyrosine and 5 or 10 μ M NTBC did not change as compared to tyrosine alone. In the case of HZR cells, the same experiments

with both NTBC and tyrosine gave the same outcome, namely no significant changes of LC₅₀ for cadmium as compared to cells exposed to tyrosine alone.

DISCUSSION

In the present study adaptation to zinc overload developed by the HZR clone (Chimienti et al., 2001) was probed at the proteomic level in an effort to determine the mechanisms allowing cells to withstand high zinc concentrations. In previous work, it has also been established (Rousselet et al. in preparation) that this clone may be exposed to large cadmium concentrations for 24 hours without much harm. However, this protection against cadmium is afforded by inhibition of metal import, whereas zinc is accumulated inside these cells. As a result, the sensitivity of HZR and the parental HeLa cells is similar when related to intracellular cadmium concentrations, despite exposure to ca. 20 times higher amounts of the toxic metal for the former as compared to the latter cells (Rousselet et al. in preparation). For these reasons, comparative analysis of the proteome of both cell lines is a way to visualize the changes induced by long-term progressive exposure to exceedingly high zinc concentrations. The biological pathways and functions suggested by these comparative studies are easily interrogated by use of specific inhibitors, and the consequences on the sensitivity to cadmium can easily be measured to gauge the involvement of these pathways in the toxicity mechanism(s).

Endoplasmic reticulum as a target of cadmium action in mammalian cells has been largely documented (Biagioli et al., 2007; Hiramatsu et al., 2007). Consequences of cadmium stress in this organelle are often described as an up-regulation of some ER chaperones such as CHOP and Bip/Grp78 (Cousins et al., 2006a), Hsp25/27, Hsp40, and Hsp70 (Gottschalg et al., 2006) in various cell lines. Interestingly, the viability of HZR cells in the presence of cadmium was far more sensitive than that of HeLa cells to the concomitant addition of the ER stressors tunicamycin and thapsigargin. These have been used here at very low concentrations that do not impact cell viability when applied alone. This strongly suggests that the HZR cells in the absence of cadmium, but with high intracellular zinc concentrations, more heavily rely on ER functions than HeLa cells. However, ER-associated chaperones, such as Grp94, PDI, and Grp78, or other components of the quality control system of protein folding, such as Hsp90, do not show significant changes between the two cell lines (Figure 1). It means that HZR cells do not display signs of generalized misfolding of proteins as compared to HeLa cells before application of cadmium.

Once cadmium is added to the cultures, perturbed protein biosynthesis does occur as witnessed by the impairment of resistance against the toxic metal in the presence of small concentrations of inhibitors of the proteasome. But, under these conditions, HeLa cells appear as sensitive as HZR cells, since the decrease of viability is similar for the same inhibitor concentration. The applied cadmium concentrations are quite different between the two cell lines, but it has been found that viability and the intracellular concentrations of the metal are similarly related for both HeLa and HZR cells (Rousselet et al. unpublished). Therefore, the increased amount of ubiquitin in HZR cells does not seem to be needed for a more efficient degradation of misfolded proteins via the proteasome pathway. It may rather be due to some other role of ubiquitin, such as protein intracellular trafficking and other important biological functions (Hurley et al., 2006).

The only detected exception to the similar concentration of chaperones between the two cell lines (Table 2) is the stress-induced phosphoprotein 1 or Hop (Hsp70/Hsp90 organizing protein) that is more abundant in HZR cells than in HeLa cells in the absence of cadmium. Hop belongs to the large group of co-chaperones which regulates the activity of heat shock proteins. Hop mediates the association of Hsc70 and Hsp90 by interacting with them through its tetratricopeptide repeat TRP1 and TRP2A domains, respectively (Scheufler et al., 2000). This molecular interaction participates in the maturation of the glucocorticoid receptor (Carrigan et al., 2005). Upregulation of Hop has also been demonstrated in activated macrophages (Heine et al., 1999).

This single example among the several chaperones identified in 2D-gels strongly suggests that adaptation of HZR cells to zinc is a well-targeted phenomenon involving only a small number of cellular components. Further experimental support for this statement is provided by the more acute sensitivity of these cells to the combined effects of cadmium and thapsigargin as compared to cadmium and tunicamycin. These two drugs have been applied at concentrations that lead to similar and minimal effects on cell viability. They target distinct activities, but they eventually trigger the same general cellular response called the Unfolded Protein Response. The larger effect of thapsigargin than that of tunicamycin in the presence of cadmium indicates that toxicity of the metal in HZR cells is more sensitive to adequate calcium intracellular distribution than to proper processing of membrane and secreted proteins.

Besides Hop, another protein being unambiguously present at higher concentration in HZR cells than in HeLa cells is the enzyme HPPD that oxidizes 4-hydroxyphenylpyruvate to

homogentisate in the tyrosine catabolic pathway. HPPD mRNA and protein are abundant in liver, kidneys, and neurons of the cortex, cerebellum, and hippocampus (Neve et al., 2003). It has been assumed that HPPD was a soluble cytoplasmic enzyme (Garcia et al., 1997), but association with membranes of the ER and the Golgi apparatus was more recently proposed (Neve et al., 2003).

Mutations in the HPPD locus can cause two distinct genetic diseases, hereditary type III tyrosinemia and hawkinsinuria (Tomoeda et al., 2000). Analyses of the HPPD gene performed in patients suffering from type III tyrosinemia and hawkinsinuria have shown a homozygous missense mutation predicting an Ala to Val change at codon 268 (A268V) in the first condition, and a heterozygous missense mutation at codon 33 (A33T) in the second one. Hawkinsinuria is an autosomal dominant disorder characterized by the excretion of hawkinsin ((2-L-cystein-S-yl, 4-dihydroxycyclohex-5-en-1-yl) acetic acid). In this case, HPPD can decarboxylate and oxidize HPP, but it cannot catalyze the final rearrangement step to homogentisate. This leads to an accumulation of the reactive epoxide intermediate which then reacts with cytoplasmic components such as glutathione (to form hawkinsin) or water (to form 4-hydroxycyclohexylacetic acid). Type III Tyrosinemia is an extremely rare autosomal recessive disorder (Ruetschi et al., 2000)). It is characterized by mild hypertyrosinemia and excessive urinary excretion of 4-hydroxyphenylpyruvic acid, 4-hydroxyphenyllactic acid, and 4-hydroxyphenylacetic acid (Endo et al., 1983). Type III Tyrosinemia was reported to be associated with ataxia and with mild mental retardation (Scott, 2006), which persisted after nutritional correction of serum tyrosine (Endo et al., 1983). Another type of Tyrosinemia, type I Tyrosinemia, is due to fumarylacetoacetate hydrolase deficiency (Tanguay et al., 1990), an enzyme occurring downstream of HPPD in tyrosine catabolism. Because symptoms of type III Tyrosinemia and Hawkinsinuria are less severe than those of type I Tyrosinemia, the latter can be treated by inhibition of HPPD, hence avoiding the buildup of the deleterious metabolites fumarylacetoacetate and succinylacetone. For this purpose, the HPPD inhibitor NTBC has been found to greatly correct many disorders associated with type I Tyrosinemia (Lindstedt et al., 1992), such as liver cirrhosis, renal dysfunction, and porphyria symptoms. These metabolic and clinical data clearly indicate that defaults of tyrosine catabolism strongly impact cellular fate.

The upregulation of HPPD upon zinc adaptation of HZR cells was unexpected. HPPD is subjected to several post-translational processing events (Aarenstrup et al., 2002; Neve et al., 2003), which may explain the presence of at least two spots on 2D gels assigned to HPPD

(Figure 2, Table 2). However, no variations between the relative intensities of these spots have been observed in our experiments. The HPPD transcript is more abundant in these cells than in the parental HeLa cell line (Figure 6). Promoter analysis evidenced a series of binding sites for several transcription factors, including Sp1, CREB, and C/EBP (Aarenstrup et al., 2002). The corresponding HPPD activity appeared more important in HZR cells than in HeLa cells since its inhibition sensitized the former cells to cadmium, whereas it had negligible effects for the latter. Therefore, considering the involvement of HPPD in tyrosine catabolism, increased availability of this amino acid was considered in relation with cadmium toxicity. A significant, though modest, impact of increased tyrosine on cadmium toxicity was measured, but this occurred for both cell lines. If increased tyrosine catabolism is needed to avoid the deleterious effects of cadmium, inactivation of HPPD should enhance cadmium toxicity in the presence of large amounts of tyrosine. Surprisingly, no additive effects of tyrosine and the HPPD inhibitor NTBC were detected, since the viability curves measured with added tyrosine and cadmium were superimposed to those measured in the presence of NTBC. This means that increased tyrosine amounts and HPPD inhibition act via different mechanisms to increase cadmium sensitivity of HeLa (only for tyrosine in this case) and HZR cells. The NTBC dose-dependant decrease of HZR cells viability in the presence of cadmium may thus be disconnected from tyrosine catabolism.

Tyrosine displays different biological roles in mammalian cells, as one of the component of proteins, but also as the precursor of catecholamines, such as dopamine, thyroid hormones, and melanin. In the cells studied here, the latter component has to be considered. This type of pigment has been shown to bind metals (Kokkinou et al., 2004; Szpoganicz et al., 2002), including zinc and cadmium, and it has been repeatedly proposed to participate in heavy metal detoxification (Loumbourdis and Vogiatzis, 2002; Nicolaus, 2005). It may then be proposed that increased synthesis of one of the tyrosine metabolites is instrumental in zinc adaptation of HZR cells. Since HPPD is up-regulated in these cells, such metabolite may be the product of this enzyme, homogentisate, or another compound appearing downstream along the tyrosine catabolic pathway. However, the latter compounds, starting with 4-maleylacetoacetate, are cytotoxic at high concentrations as exemplified in type I tyrosinemia. Therefore, homogentisate is a candidate to be considered and it is of note that this aromatic acid is a precursor of secreted melanin pigments (pyomelanin) in some microorganisms (Plonka and Grabacka, 2006). It is unknown at present if homogentisate, or a derivative, has the ability to produce heavy metal-protecting scavengers in mammalian cells. Alternatively, the HPPD

substrate, HPP, has also been shown to be a substrate of phenylpyruvate tautomerase, which produces the enol-form of HPP and is the same protein as macrophage migration inhibitory factor (MIF) (Rosengren et al., 1997). The relationship, if any, between the enzymatic function of MIF and the cytokine production by this moonlighting protein is not elucidated, and the physiological meaning of this enzymatic reaction has been questioned (Swope et al., 1998). Yet, from what is known about regulation of enzymes involved in tyrosine turnover, including HPPD (Aarenstrup et al., 2002), it is beyond doubt that signaling pathways, such as cytokine dependant ones, balance flows between the different metabolic routes available for tyrosine. In this respect, it is significant that disruption of calcium homeostasis by thapsigargin, and its consequences on signaling pathways, in HZR cells strongly impacts the resistance of these cells against cadmium. Therefore, it might be envisioned that the phenotype of HZR cells relies on a low HPP concentration that may somehow influence MIF activities.

The precise involvement of these regulatory pathways in the zinc adaptation of HZR cells cannot be readily tested with the presently implemented methods and it will be the subject of more focused studies. However, the proteomic approach described herein has revealed an unsuspected pathway in the intracellular handling of zinc overload and ensuing spectacular resistance to high cadmium concentrations for mammalian cells.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by a grant from the “*Toxicologie Nucléaire et Environnementale*” program. Dr David King (Swedish Orphan International AB, Stockholm, Sweden) is gratefully thanked for providing us with NTBC.

REFERENCES

- Aarenstrup, L., A. M. Falch, K. K. Jakobsen, S. Neve, L. L. Henriksen, N. Tommerup, H. Leffers and K. Kristiansen (2002). "Expression and post-translational modification of human 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase." *Cell Biol Int* **26**(7): 615-25.
- Berg, J. M. and Y. Shi (1996). "The galvanization of biology: a growing appreciation for the roles of zinc." *Science* **271**(5252): 1081-5.
- Beyersmann, D. and S. Hechtenberg (1997). "Cadmium, gene regulation, and cellular signalling in mammalian cells." *Toxicol Appl Pharmacol* **144**(2): 247-61.
- Biagioli, M., S. Pifferi, M. Ragghianti, S. Bucci, R. Rizzuto and P. Pinton (2007). "Endoplasmic reticulum stress and alteration in calcium homeostasis are involved in cadmium-induced apoptosis." *Cell Calcium*.
- Carmichael, J., W. G. DeGraff, A. F. Gazdar, J. D. Minna and J. B. Mitchell (1987). "Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing." *Cancer Res* **47**(4): 936-42.
- Carrigan, P. E., D. L. Riggs, M. Chinkers and D. F. Smith (2005). "Functional comparison of human and Drosophila Hop reveals novel role in steroid receptor maturation." *J Biol Chem* **280**(10): 8906-11.
- Chen, S. and D. F. Smith (1998). "Hop as an adaptor in the heat shock protein 70 (Hsp70) and hsp90 chaperone machinery." *J Biol Chem* **273**(52): 35194-200.
- Chimienti, F., E. Jourdan, A. Favier and M. Seve (2001). "Zinc resistance impairs sensitivity to oxidative stress in HeLa cells: protection through metallothioneins expression." *Free Radic Biol Med* **31**(10): 1179-90.
- Cousins, R. J., J. P. Liuzzi and L. A. Lichten (2006). "Mammalian zinc transport, trafficking, and signals." *J Biol Chem* **281**(34): 24085-9.
- Dittmar, K. D. and W. B. Pratt (1997). "Folding of the glucocorticoid receptor by the reconstituted Hsp90-based chaperone machinery. The initial hsp90.p60.hsp70-dependent step is sufficient for creating the steroid binding conformation." *J Biol Chem* **272**(20): 13047-54.
- Endo, F., A. Kitano, I. Uehara, N. Nagata, I. Matsuda, T. Shinka, T. Kuhara and I. Matsumoto, *Pediatr Res* **17** (1983) 92-6.
- Fenteany, G. and S. L. Schreiber (1998). "Lactacystin, proteasome function, and cell fate." *J Biol Chem* **273**(15): 8545-8.
- Garcia, I., M. Rodgers, C. Lenne, A. Rolland, A. Sailland and M. Matringe (1997). "Subcellular localization and purification of a p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase from cultured carrot cells and characterization of the corresponding cDNA." *Biochem J* **325** (Pt 3): 761-9.
- Gorg, A., G. Boguth, C. Obermaier and W. Weiss (1998). "Two-dimensional electrophoresis of proteins in an immobilized pH 4-12 gradient." *Electrophoresis* **19**(8-9): 1516-9.
- Gottschalg, E., N. E. Moore, A. K. Ryan, L. C. Travis, R. C. Waller, S. Pratt, M. Atmaca, C. N. Kind and J. R. Fry (2006). "Phenotypic anchoring of arsenic and cadmium toxicity in three hepatic-related cell systems reveals compound- and cell-specific selective up-regulation of stress protein expression: implications for fingerprint profiling of cytotoxicity." *Chem Biol Interact* **161**(3): 251-61.
- Heine, H., R. L. Delude, B. G. Monks, T. Espevik and D. T. Golenbock (1999). "Bacterial lipopolysaccharide induces expression of the stress response genes hop and H411." *J Biol Chem* **274**(30): 21049-55.
- Herrmann, J., L. O. Lerman and A. Lerman (2007). "Ubiquitin and ubiquitin-like proteins in protein regulation." *Circ Res* **100**(9): 1276-91.
- Hiramatsu, N., A. Kasai, S. Du, M. Takeda, K. Hayakawa, M. Okamura, J. Yao and M. Kitamura (2007). "Rapid, transient induction of ER stress in the liver and kidney after acute exposure to heavy metal: evidence from transgenic sensor mice." *FEBS Lett* **581**(10): 2055-9.
- Hurley, J. H., S. Lee and G. Prag (2006). "Ubiquitin-binding domains." *Biochem J* **399**(3): 361-72.
- Inesi, G., S. Hua, C. Xu, H. Ma, M. Seth, A. M. Prasad and C. Sumbilla (2005). "Studies of Ca²⁺ ATPase (SERCA) inhibition." *J Bioenerg Biomembr* **37**(6): 365-8.

- Kavana, M. and G. R. Moran (2003). "Interaction of (4-hydroxyphenyl)pyruvate dioxygenase with the specific inhibitor 2-[2-nitro-4-(trifluoromethyl)benzoyl]-1,3-cyclohexanedione." *Biochemistry* **42**(34): 10238-45.
- Kimmins, S. and T. H. MacRae (2000). "Maturation of steroid receptors: an example of functional cooperation among molecular chaperones and their associated proteins." *Cell Stress Chaperones* **5**(2): 76-86.
- Kokkinou, D., H. U. Kasper, K. U. Bartz-Schmidt and U. Schraermeyer (2004). "The pigmentation of human iris influences the uptake and storing of zinc." *Pigment Cell Res* **17**(5): 515-8.
- Kosano, H., B. Stensgard, M. C. Charlesworth, N. McMahon and D. Toft (1998). "The assembly of progesterone receptor-hsp90 complexes using purified proteins." *J Biol Chem* **273**(49): 32973-9.
- Lindstedt, S., E. Holme, E. A. Lock, O. Hjalmarsen and B. Strandvik (1992). "Treatment of hereditary tyrosinaemia type I by inhibition of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase." *Lancet* **340**(8823): 813-7.
- Loumbourdis, N. S. and A. K. Vogiatzis (2002). "Impact of cadmium on liver pigmentary system of the frog *Rana ridibunda*." *Ecotoxicol Environ Saf* **53**(1): 52-8.
- Martelli, A., E. Rousselet, C. Dycke, A. Bouron and J. M. Moulis (2006). "Cadmium toxicity in animal cells by interference with essential metals." *Biochimie* **88**(11): 1807-14.
- Meusser, B., C. Hirsch, E. Jarosch and T. Sommer (2005). "ERAD: the long road to destruction." *Nat Cell Biol* **7**(8): 766-72.
- Nakai, C., M. Nozaki and O. Hayaishi (1975). "Studies on a possible reaction intermediate of p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase." *Biochem Biophys Res Commun* **67**(2): 590-5.
- Neuhoff, V., N. Arold, D. Taube and W. Ehrhardt (1988). "Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250." *Electrophoresis* **9**(6): 255-62.
- Neve, S., L. Aarenstrup, D. Tornehave, H. Rahbek-Nielsen, T. J. Corydon, P. Roepstorff and K. Kristiansen (2003). "Tissue distribution, intracellular localization and proteolytic processing of rat 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase." *Cell Biol Int* **27**(8): 611-24.
- Nicolaus, B. J. (2005). "A critical review of the function of neuromelanin and an attempt to provide a unified theory." *Med Hypotheses* **65**(4): 791-6.
- Plonka, P. M. and M. Grabacka (2006). "Melanin synthesis in microorganisms--biotechnological and medical aspects." *Acta Biochim Pol* **53**(3): 429-43.
- Purpero, V. M. and G. R. Moran (2006). "Catalytic, noncatalytic, and inhibitory phenomena: kinetic analysis of (4-hydroxyphenyl)pyruvate dioxygenase from *Arabidopsis thaliana*." *Biochemistry* **45**(19): 6044-55.
- Rabilloud, T., C. Adessi, A. Giraudel and J. Lunardi (1997). "Improvement of the solubilization of proteins in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients." *Electrophoresis* **18**(3-4): 307-16.
- Rabilloud, T., C. Valette and J. J. Lawrence (1994). "Sample application by in-gel rehydration improves the resolution of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients in the first dimension." *Electrophoresis* **15**(12): 1552-8.
- Rosengren, E., P. Aman, S. Thelin, C. Hansson, S. Ahlfors, P. Bjork, L. Jacobsson and H. Rorsman (1997). "The macrophage migration inhibitory factor MIF is a phenylpyruvate tautomerase." *FEBS Lett* **417**(1): 85-8.
- Ruetschi, U., R. Cerone, C. Perez-Cerda, M. C. Schiaffino, S. Standing, M. Ugarte and E. Holme (2000). "Mutations in the 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase gene (HPD) in patients with tyrosinemia type III." *Hum Genet* **106**(6): 654-62.
- Rutkowski, D. T. and R. J. Kaufman (2004). "A trip to the ER: coping with stress." *Trends Cell Biol* **14**(1): 20-8.
- Scheufler, C., A. Brinker, G. Bourenkov, S. Pegoraro, L. Moroder, H. Bartunik, F. U. Hartl and I. Moarefi (2000). "Structure of TPR domain-peptide complexes: critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine." *Cell* **101**(2): 199-210.
- Scott, C. R. (2006). "The genetic tyrosinemias." *Am J Med Genet C Semin Med Genet* **142**(2): 121-6.

- Sinha, P., J. Poland, M. Schnolzer and T. Rabilloud (2001). "A new silver staining apparatus and procedure for matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight analysis of proteins after two-dimensional electrophoresis." Proteomics **1**(7): 835-40.
- Swope, M., H. W. Sun, P. R. Blake and E. Lolis (1998). "Direct link between cytokine activity and a catalytic site for macrophage migration inhibitory factor." Embo J **17**(13): 3534-41.
- Szpoganicz, B., S. Gidanian, P. Kong and P. Farmer (2002). "Metal binding by melanins: studies of colloidal dihydroxyindole-melanin, and its complexation by Cu(II) and Zn(II) ions." J Inorg Biochem **89**(1-2): 45-53.
- Tanguay, R. M., J. P. Valet, A. Lescault, J. L. Duband, C. Laberge, F. Lettre and M. Plante (1990). "Different molecular basis for fumarylacetoacetate hydrolase deficiency in the two clinical forms of hereditary tyrosinemia (type I)." Am J Hum Genet **47**(2): 308-16.
- Tomoeda, K., H. Awata, T. Matsuura, I. Matsuda, E. Ploechl, T. Milovac, A. Boneh, C. R. Scott, D. M. Danks and F. Endo (2000). "Mutations in the 4-hydroxyphenylpyruvic acid dioxygenase gene are responsible for tyrosinemia type III and hawkinsinuria." Mol Genet Metab **71**(3): 506-10.
- Vallee, B. L. and K. H. Falchuk (1993). "The biochemical basis of zinc physiology." Physiol Rev **73**(1): 79-118.
- Wagner, E., S. Luche, L. Penna, M. Chevallet, A. Van Dorsselaer, E. Leize-Wagner and T. Rabilloud (2002). "A method for detection of overoxidation of cysteines: peroxiredoxins are oxidized in vivo at the active-site cysteine during oxidative stress." Biochem J **366**(Pt 3): 777-85.

Table 1. Oligonucleotide primers used for RT-PCR

Primer Name	GenBank accession number	Sequence 5'→3'	Product Size (bp)	Annealing T (°C)
HPPD	NM_002150	- ATC GCT CTC AAG ACC GAA GA - (F) - CGT CGT AGT CCA CCA GGA TT - (R)	184	62
β-actin	NM_001101	-GAG AAG ATG ACC CAG ATC ATG TTT GAG ACC-(F) -TAG CAC AGC CTG GAT AGC ACC GTA-(R)	71	60
GAPDH	NM_002046	-ATG GGG AAG GTG AAG GTC G-(F) -GGG GTC ATT GAT GGC AAC AAT A-(R)	108	60
RPLPo2	NM_001002	-GAA ATC CTG GGT GTC CGC AAT GTT-(F) -AGA CAA GGC CAG GAC TCG TTT GTA-(R)	114	60

Table 2. Identification of proteins differently present in HeLa and HZR cells. The labeled spots in Figure 2 are indicated with their identification using MALDI-TOF with sequence coverage (% R). Swiss-Prot accession numbers, monomer masses and isoelectrofocusing points obtained for each protein are also given.

SPOT	PROTEINE	ACC.	MW / pI	%R	Concentration in HZR vs HeLa
a	4-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	P32754	44775 / 6,50	44%	UP
b	Thioredoxin reductase GRIM-12	Q9UES8	54580 / 6,36	21%	UP
c	Stress-induced-Phosphoprotein 1	P31948	62599 / 6,40	8%	UP
d	Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit, mitochondrial precursor	P31040	72645 / 7,06	29%	UP
e	Carbonic anhydrase II	P00918	29097 / 6,86	44%	DOWN
M1	UBIQUITIN	Q9VZL4	8560 / 6,56	85%	UP

FIGURE LEGENDS

Figure 1 2-D electrophoresis of total cell extract proteins from HeLa (A) and HZR (B).

Two hundred micrograms of proteins were separated on pH 4-8 linear immobilized pH gradients and 10% continuous SDS gels. Molecular markers are indicated at the right of the gel in (B). Detection was by silver staining. Some easily identified proteins, mainly chaperones, are indicated in the bottom gel with PDI: protein disulfide isomerase and 40S: a 40S ribosomal protein.

Figure 2 Highly resolved part of the 2-D electrophoretic gels of total HeLa (A) and HZR (B) cell extracts.

Five hundred micrograms of proteins were separated on pH 5.5-7.5 linear immobilized pH gradients and 10% continuous SDS gels. Molecular markers are on the right side of the gels. Detection was by Coomassie Brilliant Blue for micropreparative gels. Labeled spots were identified as reported in Table 2.

Figure 3 Low molecular weight part of 2-D electrophoretic gels of total HeLa (left) and HZR (right) cell extracts. Proteins were separated on pH 4-8 linear immobilized pH gradients and 12% SDS gels. Identification of the M1 and M2 spots is given in the text and Table 2.

Figure 4 Effects of ER stress on the viability of HeLa and HZR cells in the presence of cadmium. HeLa cells were stressed by cadmium alone (A open square) or either in presence of 50 nM thapsigargin (A open circle) or in presence of 50 nM tunicamycin (A open triangle) 24 h before measuring viability. The same experiments were done for HZR cells (B) with same filled symbol. For HZR cells, 200 μ M of zinc used to maintain these cells were replaced by cadmium. Viable cells were measured by the MTT assay. SD resulted from the same number of experiments as described for HeLa cells.

Figure 5 Proteasome involvement in the sensitivity of HeLa and HZR cells to cadmium toxicity. (A) Parental HeLa (open triangle) and HZR cells (filled triangle) were treated with increasing concentrations of lactacystin in the growth medium for 24 hours and the percentage of viable cells was measured and reported to that of non-exposed cells. (B) HeLa cells were stressed by cadmium alone (open squares) or in the presence of 2.5 μ M lactacystin (open

triangles) for 24 h before measuring viability. **(C)** The same experiment as in **(B)** was carried out with HZR cells without (filled squares) or with 2.5 μ M lactacystin (filled triangles). The zinc concentration used to maintain these cells was replaced by cadmium at the time of stress. Error bars were calculated from 8 measurements in two separate experiments. Experimental data were fitted to a sigmoid curve from which LC_{50} values were derived as the 50% intersecting points.

Figure 6 Real-time PCR of HPPD. Real-time quantitative, reverse transcriptase polymerase chain reaction experiments were carried out with total RNA purified from HeLa (empty bars) and High Zinc Resistant cells (filled bars). The results were calculated as a ratio to the set of reference genes (ribosomal phosphoprotein PO, GAPDH and β -actin) and the value for HeLa cells was arbitrarily set to 1. Data are the mean \pm SD in two separate experiments.

Figure 7 HPPD inhibition and cadmium toxicity in HeLa and HZR cells. **(A)** Parental HeLa (open bars) and HZR cells (filled bars) were treated with increasing concentrations of NTBC in the growth medium for 24 hours and the viability was measured by the MTT assay. The reported standard deviations were calculated from 8 separate measurements. **(B)** Parental HeLa cells were stressed by cadmium alone (open squares) or in the presence of 5 μ M NTBC (open diamonds) 24 h before measuring viability. **(C)** The same experiments were done with HZR cells and represented with the same filled symbols. Other details are as in the legend of Figure 5.

Figure 8 Tyrosine and cadmium toxicity in HeLa and HZR cells. **(A)** Parental HeLa cells were stressed with cadmium alone (open squares) or in the presence of 3 mM tyrosine (inversed opened triangles) for 24 hours. The viability was measured by the MTT assay and the reported standard deviations were calculated from 8 separate measurements. Experimental data were fitted to a sigmoid curve from which LC_{50} values were derived as the 50% intersecting points. **(B)** The same experiments were done with HZR cells and represented with the same filled symbols.

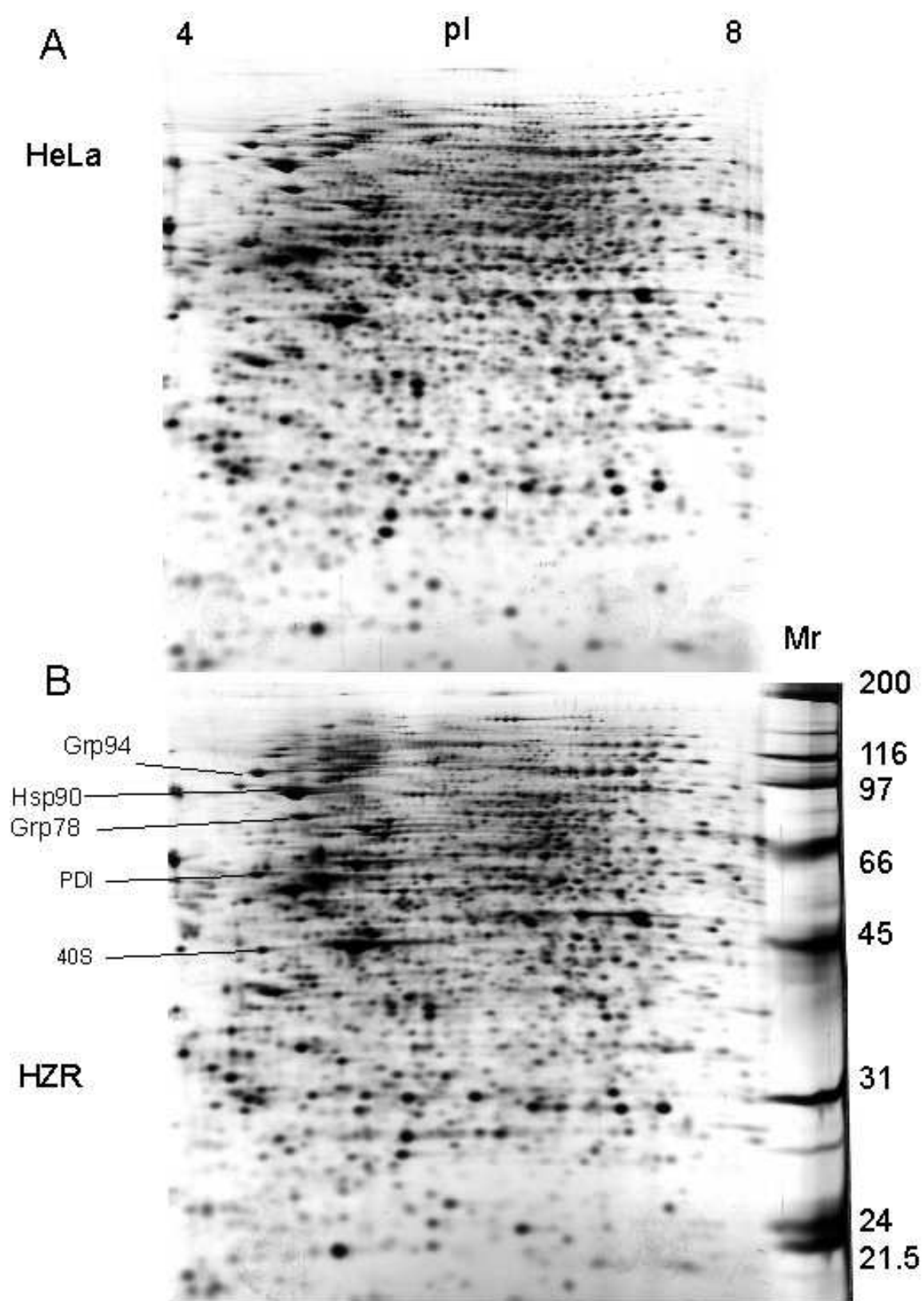


Figure 1

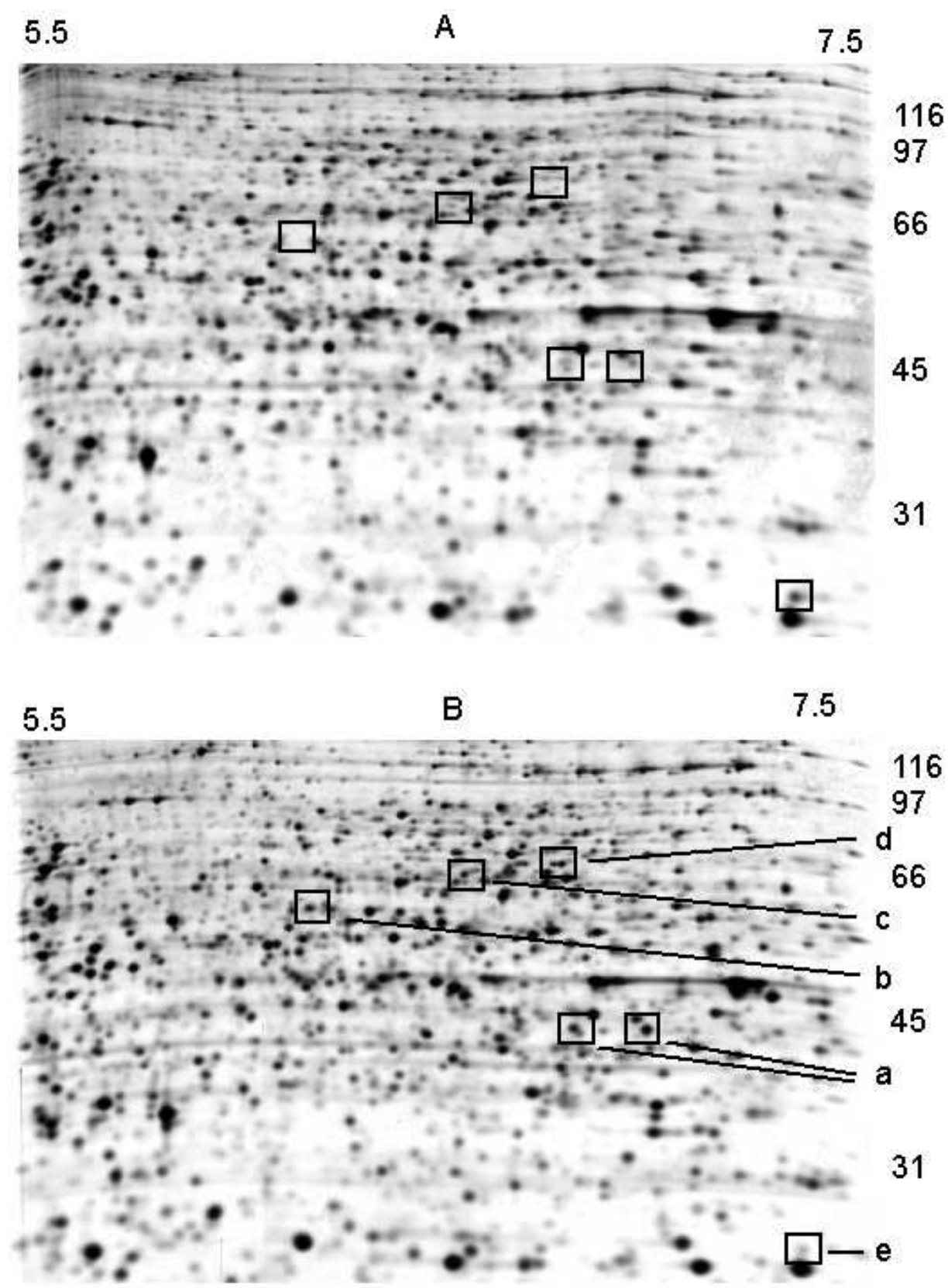


Figure 2

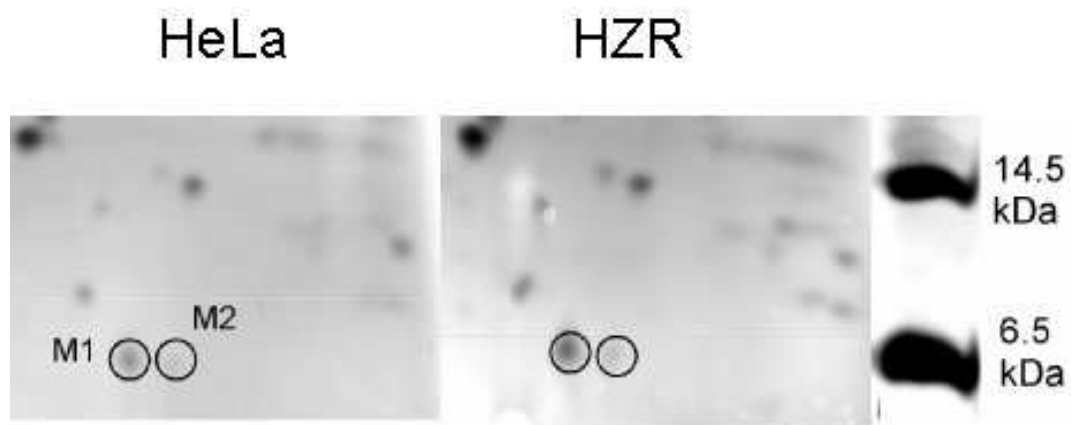


Figure 3

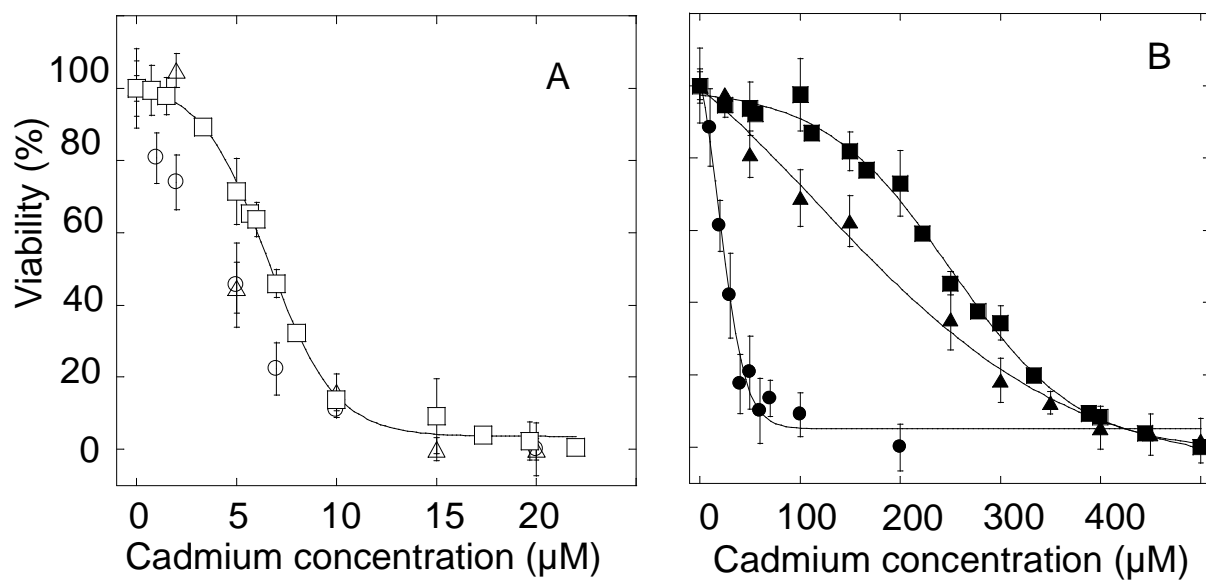


Figure 4

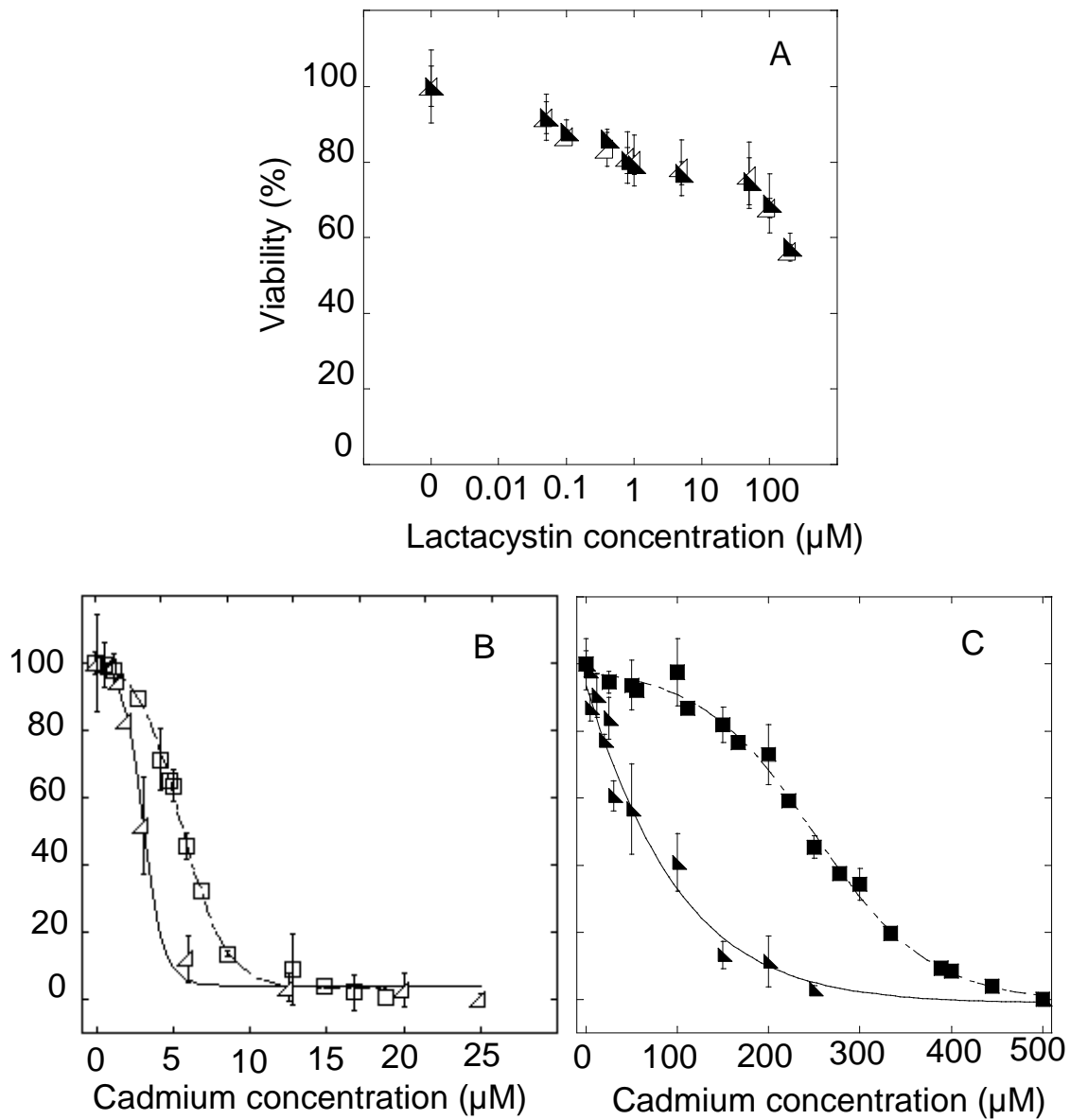


Figure 5

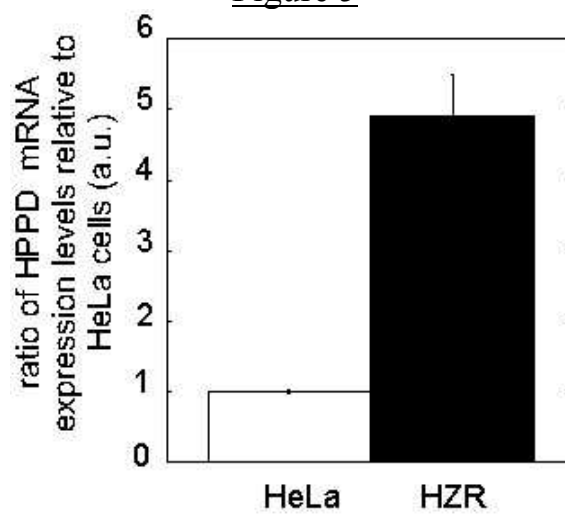


Figure 6

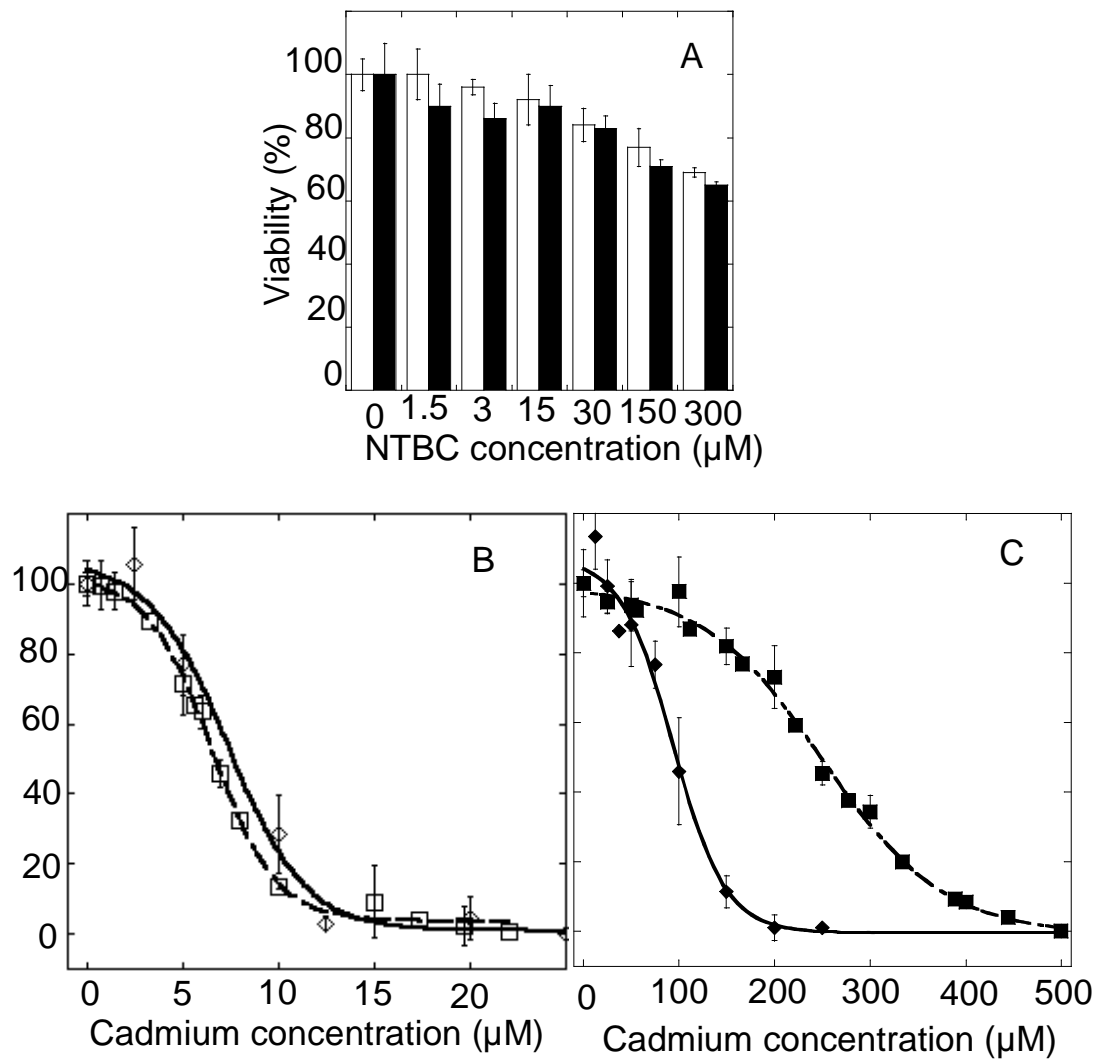


Figure 7

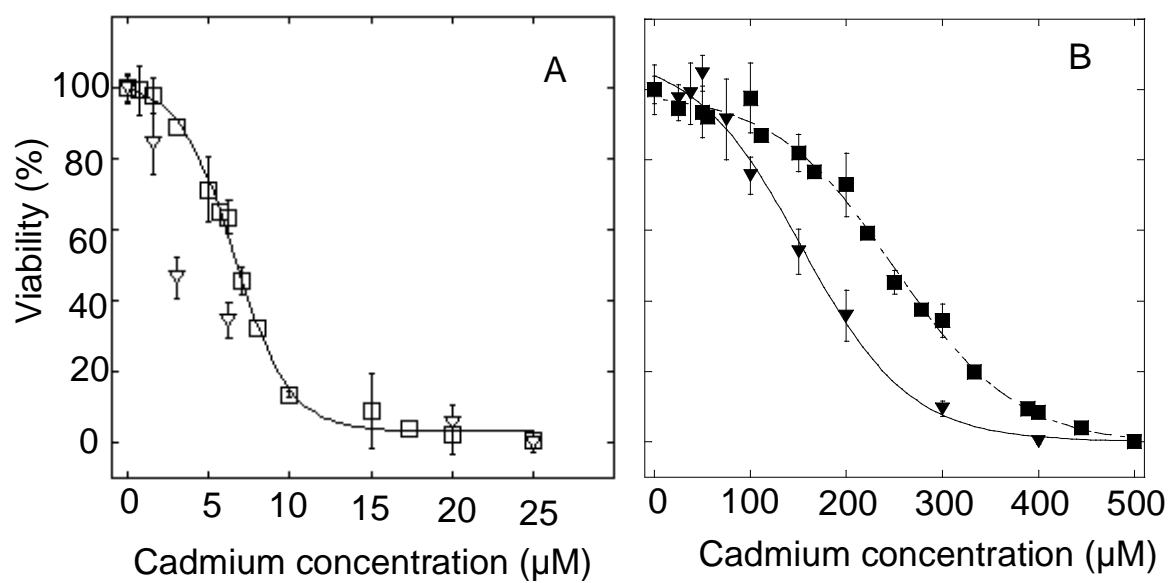


Figure 8

Chapitre 4 : Etude de l'effet du cadmium et du zinc sur la réponse transcriptionnelle des cellules HZR.

Chapitre 4 : Etude de l'effet du cadmium et du zinc sur la réponse transcriptionnelle des cellules HZR.

IV-1. Présentation des axes de travail

Nous avons déterminé essentiellement au cours du premier chapitre, que les cellules HZR étaient résistantes aux fortes concentrations de cadmium. Cela n'est dû ni à la limitation de dommages à l'ADN, ni à des mécanismes efficaces d'exclusion du toxique, mais bien à une limitation de l'entrée de cadmium. Ces mécanismes de défense vis-à-vis du cadmium, quels qu'ils soient, sont bien moins efficaces dans les cellules HeLa. Dans un premier temps, nous avons entrepris d'analyser par RT-PCR le niveau d'expression de quelques gènes des protéines responsables de l'efflux de toxiques, ainsi que de quelques candidats récemment impliqués dans l'entrée du cadmium dans certaines cellules (Chapitre I). Le but de ce travail était de déterminer si le phénotype de résistance observé dans les cellules HZR était la conséquence de différences de niveaux d'expression de ces transcrits entre les cellules HZR et les cellules HeLa à l'état basal. En effet, la plupart des études précédentes a conclu à des différences au niveau transcriptionnel pour expliquer les phénomènes de résistance (Dalton et al., 2005; Leslie et al., 2006; Ohana et al., 2006; Vernhet et al., 1999). Parmi les quelques gènes étudiés, aucun changement significatif du taux d'expression de ces transcrits pouvant expliquer les différences de phénotype entre les deux lignées n'a été établi. L'une des limites de cette approche est qu'elle reste focalisée sur l'analyse d'un nombre restreint de gènes préalablement associés au trafic de cadmium. Or, rien ne prouve que l'inventaire de ces gènes soit actuellement exhaustif pour tous les types cellulaires de mammifères. La quatrième et dernière partie de ce travail est donc conçue dans le but d'essayer de répondre, d'une part à la question de la résistance des cellules HZR vis-à-vis du cadmium, et d'autre part de savoir quel est l'effet du cadmium intracellulaire dans les cellules HZR. Pour répondre à ces deux questions et parce que nous soupçonnions initialement des transporteurs localisés à la membrane plasmique, non identifiés dans les études antérieures, nous avons entrepris une étude non ciblée et à une plus grande échelle des variations globales du transcriptome.

Le séquençage du génome humain a mis en évidence l'existence d'environ 30000 gènes. La réponse cellulaire à un évènement exogène (application de cadmium par exemple) fait intervenir de nombreuses régulations transcriptionnelles, traductionnelles et post-traductionnelles. L'étude des variations des niveaux de transcrits donne une idée précise de la réponse cellulaire à une perturbation donnée. Cependant, elle ne rend compte que d'une des premières étapes de cette réponse, sans information sur les taux de protéines et leurs modifications. Une approche protéomique, complémentaire aux travaux présentés ici, a été mise en œuvre dans le Chapitre III.

IV-2. Définition et principaux types de puces à ADN

Une « puce » à ADN, souvent désignée dans le jargon anglais par « *biochip* » ou « *DNA microarray* », est constituée de fragments d'ADN (sondes, *probes*) immobilisés sur un support solide selon une disposition ordonnée. Une puce comporte quelques centaines à plusieurs dizaines de milliers d'unités d'hybridation appelées « *spots* » (pour tache), chacune étant constituée d'un dépôt de fragments d'ADN ou d'oligonucléotides correspondant à une séquence donnée. L'hybridation de la puce avec un échantillon biologique d'ADN ou d'ARN (*targets*) marqué par un radioélément ou par une molécule fluorescente, permet de détecter et de quantifier l'ensemble des cibles qu'il contient en une seule expérience.

D'abord conçues sur des membranes poreuses de nylon (appelées parfois « *macroarrays* » par opposition aux « *microarrays* »), les puces à ADN ont été progressivement mises au point sur lames de verre à la fin des années 90. La miniaturisation, rendue possible par l'utilisation d'un support solide, de marqueurs fluorescents et par les progrès de la robotique, permet aujourd'hui de fabriquer des puces comportant une très haute densité de spots, susceptibles de recouvrir l'intégralité du génome d'un organisme sur une simple lame de microscope.

Aujourd'hui il existe trois types différents de puces à ADN qui se distinguent selon la nature des molécules déposées et du support utilisé, la densité des spots et les méthodes de fabrication et d'hybridation. Les caractéristiques des puces les plus courantes sont résumées ci-dessous.

➤ Les **macroarrays**, constitués de produits PCR déposés sur membrane de nylon ont été utilisés à plusieurs reprises pour étudier l'expression de gènes chez les animaux (Nguyen et al., 1995; Pietu et al., 1996) et chez les végétaux (Fedorova et al., 2002). Les cibles sont des ADNc marquées radioactivement au ^{32}P . Toutefois, la faible densité du dépôt (inférieure à 50 spots/cm²) implique l'étude d'un nombre restreint de gènes.

➤ Les **microarrays**, caractérisés par une densité de dépôt beaucoup plus élevée (jusqu'à 20 000 spots/cm²) permettent le dépôt de plusieurs milliers de gènes sur une puce de taille réduite. Ce système est donc mieux adapté à l'analyse simultanée et à grande échelle de l'expression de grandes quantités de gènes différents. A la différence des membranes de nylon, le support des *microarrays* est constitué de lames de verre, ce qui permet une plus grande accessibilité des molécules cibles d'ADNc pour les sondes (Khrapko et al., 1989; Southern et al., 1999). De plus, l'emplacement des sondes est beaucoup plus régulier que dans le cas des membranes de nylon, ce qui facilite l'acquisition et le traitement des images. Les sondes sont des produits de PCR ou des oligonucléotides longs (30-70mers). Ces sondes ciblent les ADNc ou des produits de PCR marqués avec des fluorochromes de la famille des cyanines, Cy3 (fluorescence verte, Exc/Em : 550/570nm) et Cy5 (fluorescence rouge, Exc/Em : 650/670nm). Leur utilisation rend possible la comparaison des niveaux d'expression de très nombreux gènes entre deux conditions expérimentales.

➤ Enfin, les **puces oligonucléotidiques synthétiques** qui ont une densité de spots inégalée (250 000 spots/cm²) et dont la sonde est constituée d'oligonucléotides courts (de 20 à 30 mers). Parmi les puces à oligos, les puces GeneChip[®] développées par la société Affymetrix (*oligoarrays*) sont construites par synthèse des oligos *in situ* (*on-chip*) ou immobilisation sur la matrice (*off-chip*) directement sur la lame de verre par photolithographie. Les cibles sont constituées d'ADNc ou de produits de PCR ayant un marquage à la biotine-streptavidine. La conception des séquences oligonucléotidiques spécifiques d'un gène s'effectue *in silico* et ne nécessite que la connaissance de la séquence d'intérêt. Par contre, le coût très élevé de cette technique, qui exige l'emploi de méthodes et d'équipements particuliers, freine son expansion.

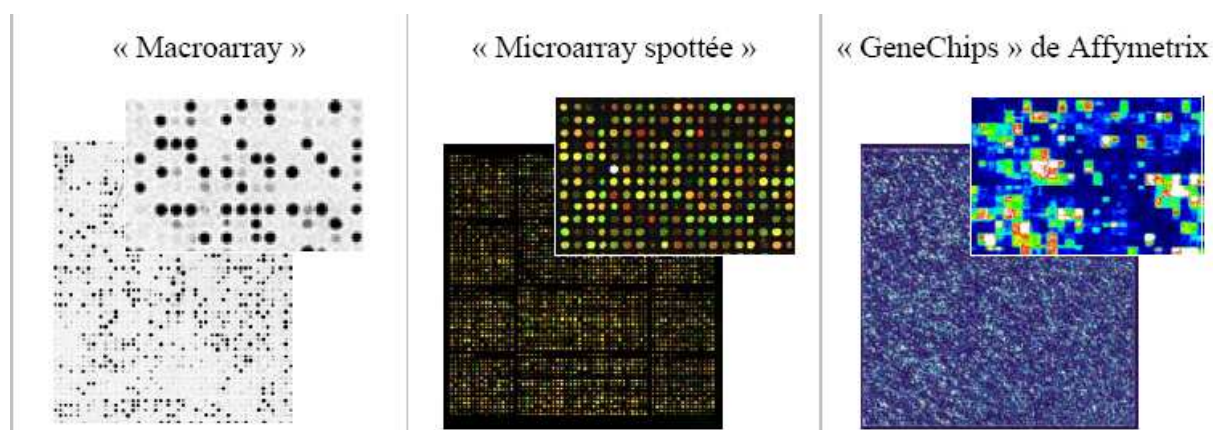


Figure IV-1 : Différents types de puces pour étudier le transcriptome

<http://www.transcriptome.ens.fr/sgdb/presentation/principe.php>

Notre approche dans le cadre de mon travail de thèse est basée sur l'utilisation de puces *microarray* qui possèdent comme sonde des oligonucléotides de 50 mers (Collection Human 30K OciChip™), immobilisés sur le support à l'aide de robots. Cette procédure est effectuée par la plateforme transcriptomique - Puces à ADN de Nantes (IFR 26 - UFR de Médecine).

La méthode de fabrication des puces « spottées » a été développée par l'équipe de P.Brown à l'université de Stanford, aux Etats-Unis (DeRisi et al., 1997). Des solutions d'ADN sont préparées soit par amplification par PCR à partir du génome ou de banques d'ADN complémentaires, soit par synthèse d'oligonucléotides longs (30-70 mers). Des micro-gouttelettes de ces solutions sont ensuite déposées par un robot, selon une matrice d'emplacements définis, sur une lame de verre traitée par un revêtement chimique qui permet de fixer l'ADN. En général, chaque spot de la matrice correspond à un gène donné.

L'utilisation des puces « spottées » permet d'acquérir une mesure relative du niveau d'expression des gènes dans un échantillon cellulaire par rapport à un témoin de référence, par exemple des cellules cultivées dans deux conditions différentes. Le principe expérimental est résumé dans la Figure IV-2:

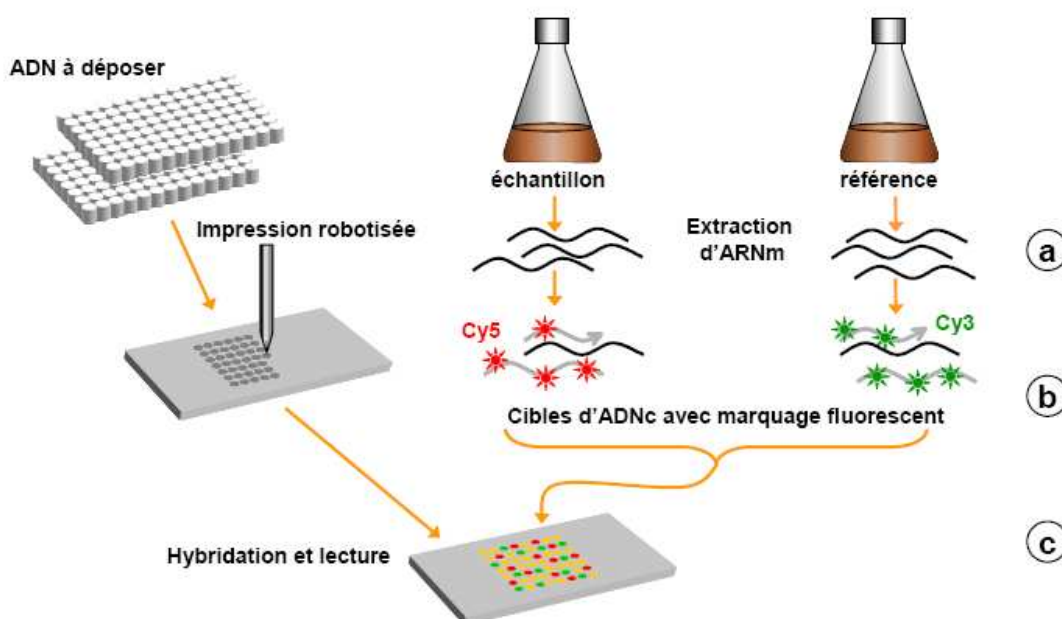


Figure IV-2 : Analyse de l'expression transcriptionnelle sur une puce spotted :
WLin-these%20data/microarray-WLin-2004.pdf

- a- Les ARNm sont extraits des prélèvements de cultures cellulaires à analyser.
- b- Une transcription reverse est réalisée en présence de nucléotides modifiés permettant de coupler un marqueur fluorescent. Des cibles d'ADN complémentaires (ADNc) représentatives de l'ensemble des gènes exprimés pour chaque culture sont ainsi obtenues.
- c- Les deux échantillons marqués par des fluorochromes à spectres d'émission distincts (carbocyanines Cy3 et Cy5) sont hybridés simultanément sur une même puce. Au contact de la puce, les brins d'ADNc marqués s'apparient avec les sondes de séquence complémentaire sur la lame. La mesure de l'intensité du signal fluorescent émis sur chaque spot permet ainsi d'estimer le taux d'expression différentiel du gène correspondant.

IV-3. Stratégie d'étude

IV-3.1 Culture cellulaire et traitements

Le but de cette étude est d'identifier des transcrits impliqués dans la résistance des cellules HZR au cadmium et qui sont sélectionnés par le zinc. Cependant, pour effectuer cette étude, nous avons choisi de nous affranchir de l'utilisation de la lignée HeLa, car une étude transcriptomique

visant à comparer les deux lignées nous aurait probablement conduit à de grandes différences, pas toutes en rapport avec l'analyse du phénotype considéré. En effet, les cellules HZR ont été développées par exposition longue et progressive à de fortes concentrations de zinc (Chimienti et al., 2001) et nous ne savons pas si elles ont subi des modifications génomiques importantes, en sus de celles provoquant le phénotype de résistance réversible au cadmium, seul étudié ici. Nous avons donc contourné le problème, suite à la proposition de Nicolas Ugolin (Laboratoire de Cancérogenèse Expérimentale, CEA Fontenay-aux-Roses), bio-informaticien avec qui j'ai étroitement travaillé, en utilisant les seules cellules HZR dont les concentrations en zinc et cadmium dans le milieu de culture ont été manipulées comme décrit ci-après. Ces conditions permettent de s'affranchir des éventuelles modifications génomiques irréversibles s'étant produites entre le clone HZR et les cellules HeLa de référence, et de focaliser l'étude sur la partie du transcriptome des cellules HZR impliquée dans la réversibilité du phénotype de résistance vis-à-vis du zinc et du cadmium (voir Chapitre I).

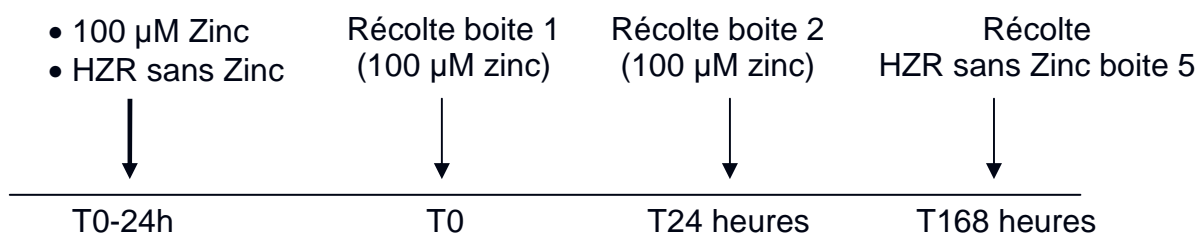
Les conditions expérimentales choisies pour l'étude sont les suivantes :

Vingt-quatre heures avant le temps T₀, cinq boîtes de diamètre 10 cm ont été inoculées par 800 000 cellules HZR dans le milieu DMEM, 2 mM L-glutamine, 5% sérum veau fœtal. Dans quatre boîtes sont ajoutés 100 µM de zinc et dans la cinquième rien n'a été ajouté. Les cellules HZR maintenues dans le milieu sans zinc ont subi deux passages dans le même milieu au cours de la semaine (division par deux à chaque passage pour atteindre 90% de confluence au moment de la récolte). Les cellules HZR ainsi traitées ont un phénotype qui se rapproche de celui des cellules HeLa (Chimienti et al., 2001), Chapitre I, sans que leur génome ait vraiment eu le temps d'évoluer. A T₀, les milieux de trois des quatre boîtes contenant 100 µM de zinc sont changés. La boîte #1 qui contenait 100 µM de zinc est récoltée, pour l'autre (#2) le milieu est remplacé par un milieu identique contenant 100 µM de zinc. Dans une autre boîte (#3) sont ajoutés 100 µM de zinc et 100 µM de cadmium (condition Cd+Zn+) afin d'étudier l'effet additif du zinc sur la résistance vis-à-vis du cadmium et dans l'autre (#4) sont ajoutés 100 µM de cadmium (Cd+) qui permet d'étudier l'effet du cadmium sur les cellules HZR en remplacement du zinc. Pour ces études transcriptomiques, trois cultures indépendantes de cellules ont été utilisées et stressées en parallèle et le traitement a été débuté sur des cellules au cours de leur cinquième passage. Ceci

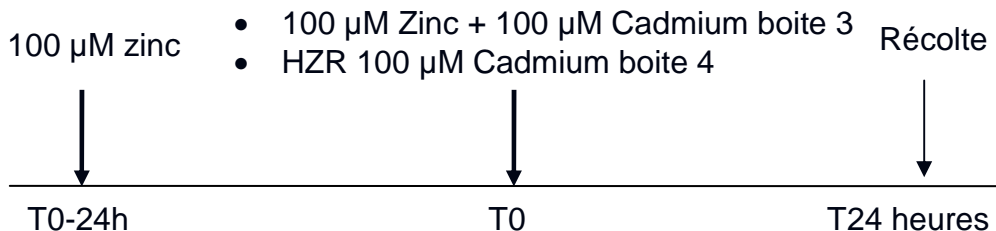
a été répété pour la condition de la boîte 4 pour laquelle les données d'une lame initiale n'avait pas pu être conservées (voir IV-4.2).

Pour les cellules correspondant à la condition T0, environ 1.6×10^6 cellules ont été récoltées dans chaque boîte, pour la condition T24, environ 3×10^6 cellules ont été récoltées, pour les conditions Cd+Zn+ et Cd+, 2.5×10^6 cellules ont été récoltées et pour la condition -Zn, environ 3×10^6 cellules ont été récoltées.

❖ Effet zinc : régulation de l'expression génique par le zinc dans les cellules HZR



❖ Effet cadmium :



En parallèle, les tests de viabilité en présence de cadmium pendant 24 heures sur ces cellules ont été effectués de la même manière qu'indiqué dans le chapitre 1.

IV-3.2 Principe de l'hybridation sur puces.

Le profil d'expression des transcrits des cellules HZR a été obtenu par comparaison avec un mélange d'ARN de diverses sources décrites ci-dessous, que l'on nommera ARN de référence (Chevallard et al., 2004), commun à toutes les expériences, réalisées au laboratoire de cancérogenèse expérimentale du CEA de Fontenay-aux-Roses, ce qui permet de comparer au besoin les résultats de plusieurs expériences sans lien entre elles. Pour cela nous disposons d'un mélange d'ARN de référence (noté RH, *référentiel* humain), composé d'ARN totaux de cellules tumorales humaines mammaires (MCF-7, T-47D),

lymphoblastoïdes (Boleth) et pulmonaires (A-549) en égales proportions; ce mélange a été réalisé pour obtenir une grande diversité d'ADNc présents dans le référentiel.

Pour chaque condition expérimentale, des quantités égales d'ARN totaux expérimentaux et du mélange d'ARN de référence ont été rétro-transcrits en ADNc. Puis la réaction de transcription *in vitro* est l'étape d'amplification permettant l'amplification linéaire des ADNc en ARN antisens, ainsi que l'incorporation d'un nucléotide modifié (5-(3-aminoallyl)-UTP). L'aa-UTP contient un groupe réactif en position C5 de l'uracil qui peut ensuite être couplé à la fonction dérivée N-Hydroxysuccinimidyl de l'ester, ce qui permet la fixation des fluorochromes Cy3 ou Cy5 monofonctionnels NHS-ester sur le mélange d'ADNc. Les ADNc marqués (ADNc expérimentaux et ADNc de référence) ont alors été mélangés en quantité égales avant d'être co-hybridés sur la puce. Le rapport de fluorescence entre les deux fluorochromes sur chaque spot représente en théorie l'expression différentielle de chaque gène par rapport à cette référence (Figure IV-3).

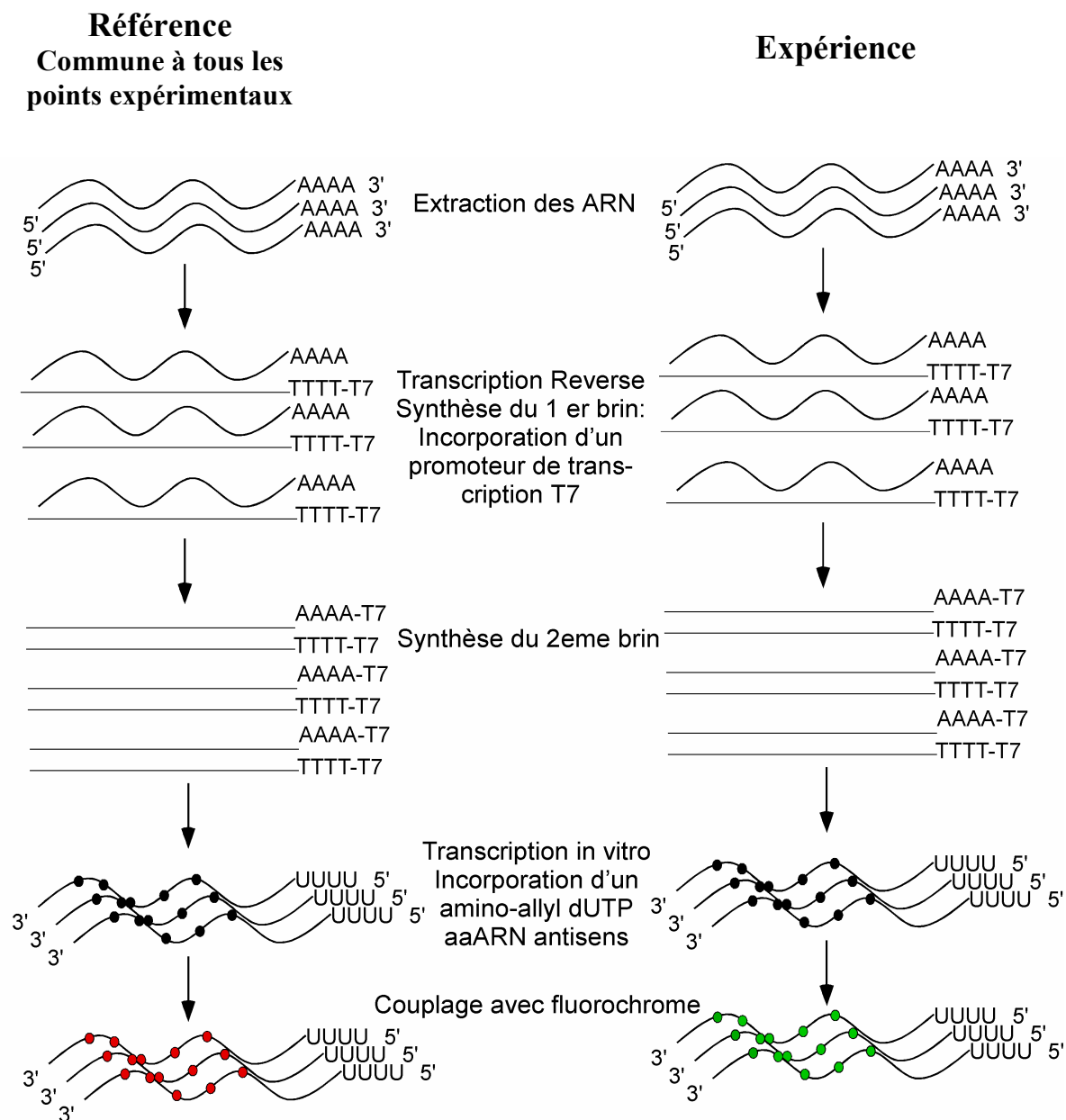


Figure IV-3 : Hybridation différentielle

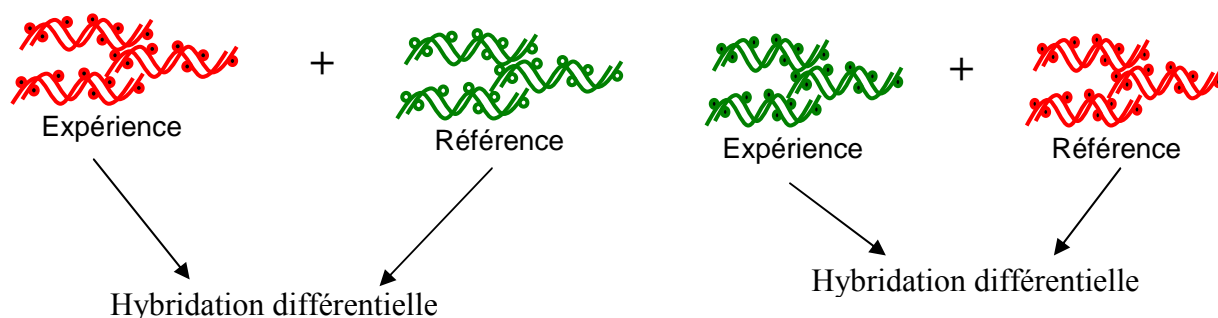


Figure IV-4 : Hybridation en double inverse

Deux hybridations croisées ont en fait été réalisées pour chaque point expérimental : dans une première hybridation, les ADNc expérimentaux ont été marqués au Cy3 tandis que les ADNc de référence étaient marqués au Cy5 ; dans une seconde hybridation, les fluorochromes associés aux ADNc expérimentaux et de référence étaient inversés. C'est le principe de l'hybridation en double-inverse (*Dye Swap*) (Figure IV-4), qui permet d'éliminer les points aberrants et de normaliser le signal. Les rapports d'expression finaux pour chaque sonde correspondent à la moyenne des valeurs des *rapports d'expression* pour chaque *dye swap*.

IV-3.2 a La puce utilisée

Les puces utilisées dans le laboratoire viennent de la compagnie Ocimum. Les sondes sont des oligonucléotides de 50 mers qui sont greffées par un robot (Microgrid II Pro-Arrayer, Biorobotics Ltd, UK) sur une lamelle de verre recouverte de poly-L-lysine (Menzel Glaser, CML, France), en suivant un protocole expérimental dérivé de celui élaboré par DeRisi *et coll* (DeRisi et al., 1997). Au total, l'ensemble des sondes permet de mesurer simultanément l'expression d'environ 20000 gènes (Collection Human 30K OciChip™ A et B dont les redondances ont été enlevées).

IV-3.2 b Préparation des ARN (voir **Matériels et Méthodes** comprenant les figures IV-5 et 6)

IV-4 Acquisition et analyse des données

IV-4.1 Acquisition des images

Après hybridation, chaque lame est scannée à une résolution de 10 μm avec un scanner confocal (Scan array Express, PerkinElmer) aux deux longueurs d'ondes (Cy3=532 nm et Cy5=635 nm), correspondant aux marquages des deux échantillons hybridés. Pour chaque longueur d'onde d'excitation, deux acquisitions sont effectuées avec des réglages de puissance laser et de gains de photomultiplicateur différents favorisant respectivement, les *spots* faiblement hybridés (les *spots* fortement hybridés sont saturés), et les spots fortement hybridés (les *spots* faiblement hybridés sont invisibles).

Deux images sont obtenues pour chaque marquage, au format TIFF codant sur 16 bits compris entre 0 (noir) et 65535 (blanc) niveaux de gris. La gamme d'intensité de signal d'hybridation détecté est donc étendue par chevauchement des signaux provenant des deux images. Les étapes suivantes, allant du traitement du signal des images à la détermination des rapports d'expression pour chaque gène, ont été effectuées par Nicolas Ugolin à l'aide de logiciels développés par l'équipe de bio-informatique du laboratoire du Dr. Chevillard, CEA de Fontenay aux Roses.

IV-4.2 Quantification et normalisation des rapports d'expression de gènes

IV-4.2 a Elimination du bruit de fond et calcul d'un facteur de robustesse.

Toutes les étapes qui suivent ont pour but de sélectionner les gènes présentant des variations d'expression significatives. Le traitement des données est réalisé simultanément sur les 3 expériences répétées, indépendantes pour les 5 conditions de culture.

La position de chaque *spot* est automatiquement déterminée pour chaque image à l'aide d'un système de positionnement de grilles basé sur l'algorithme SurfView (Image-analysis spot-tracking software (patent US 10/173,672 June, 19, 2002; CA 2,389,901 June, 20, 2002) décrit ci-dessous.

Pour chaque image, les pixels provenant de chaque *spot*, circonscrits dans un cercle, sont segmentés en bruit de fond local et signaux provenant de l'hybridation des cibles, selon un algorithme spécifique d'estimation-maximisation. L'intensité d'hybridation est estimée

comme l'intensité moyenne de la population obtenue pour les pixels d'hybridation soustraite à la moyenne de la population des pixels du bruit.

Chaque niveau d'expression est exprimé en fonction d'un niveau de référence. Cette référence est constituée du mélange d'ARN totaux de cellules tumorales humaines mammaires, lymphoblastoïdes et pulmonaires en égales proportions, dont les ARN ont été rétrotranscrits puis amplifiés comme décrits précédemment. Dans toute la partie d'analyse elle sera notée Ref. Ainsi l'hybridation en double inverse (*dye swap*) permet pour chaque sonde de normaliser et de réduire l'erreur commise entre les deux mesures réalisées pour l'échantillon d'intérêt (Schuchhardt et al., 2000), de même que pour celles de la référence. La détermination de chaque point expérimental aboutit donc à la mesure de quatre valeurs :

- Hybridation 1 : L'échantillon d'intérêt (Exp) marqué au Cy5 est hybridé à l'échantillon de référence (Ref) marqué au Cy3.
- Hybridation 2 : L'échantillon d'intérêt (Exp) marqué au Cy3 est hybridé à l'échantillon de référence (Ref) marqué au Cy5.

Les valeurs mesurées sont des valeurs qui nécessitent une correction en fonction du *biais*¹ commis. De plus pour chaque couple d'hybridation du *dye swap*, c'est à dire Ref marqué au Cy3, Ref marqué au Cy5 ou Exp marqué au Cy3, Exp marqué au Cy5 est affecté un facteur de reproductibilité. Chaque couple est placé sur un diagramme (Figure IV-7 représentation de Exp_{Cy3} , Exp_{Cy5}). On obtient un nuage de points dont on peut calculer la régression linéaire. L'écart entre la droite de pente 1 et d'origine 0 et la régression linéaire est représentative de l'erreur systématique commise. Afin de corriger les valeurs, les paramètres de la rotation et de la translation nécessaires pour ramener la droite de régression vers une droite de pente 1 et d'origine 0 sont appliqués à l'ensemble des couples de valeurs brutes.

La dispersion du nuage de points autour de la droite de régression est représentative des erreurs sporadiques. Pour chaque point, la reproductibilité de la mesure est définie par les ratios de fluorescence R_t (pour les intensités de l'échantillon de référence Ref) et R_x (pour les

¹ Le *biais* affecte l'ensemble des points mesurés et dépend partiellement de facteurs tels que l'impression des sondes sur la puce (*spotting*), le balayage (*scanning*) ou le marquage.

intensités des échantillons d'intérêt Exp), qui nous indiquent ainsi l'erreur sporadique²

$$\text{commise pour chaque spot } i \text{ (gène): } Rt_i = \frac{\frac{(Ref_1)_i}{\sum Ref_1}}{\frac{(Ref_2)_i}{\sum Ref_2}} \quad Rx_i = \frac{\frac{(Exp_2)_i}{\sum Exp_2}}{\frac{(Exp_1)_i}{\sum Exp_1}}$$

Rt et Rx représentent le rapport de la fluorescence d'hybridation d'un spot i par rapport à la fluorescence totale du signal d'hybridation. Les indices 1 et 2 correspondent respectivement aux fluorochromes Cy3 et Cy5.

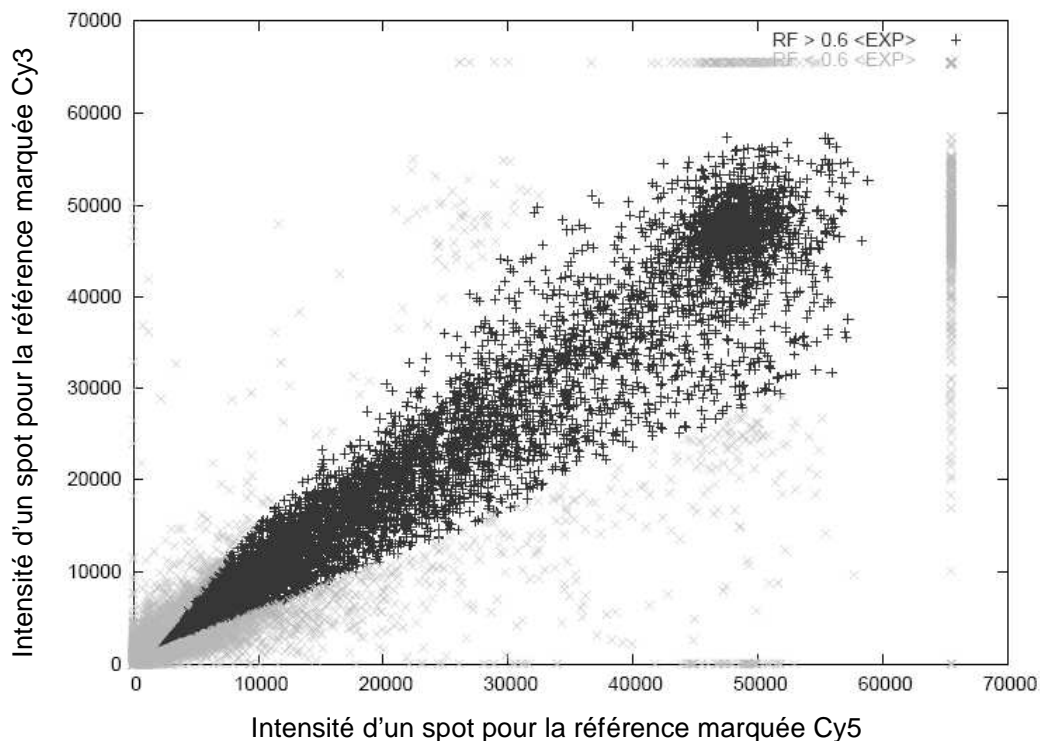


Figure IV-7 : Détermination de la reproductibilité des couples (RefCy3, RefCy5) de valeurs pour une hybridation en double inverse.

On définit alors pour chaque point i un *facteur de reproductibilité* Rf , tel que :

$$\text{si } Rt.Rx < 1 : Rf = Rt.Rx$$

$$\text{si } Rt.Rx > 1 : Rf = (Rt.Rx)^{-1}$$

² L'erreur sporadique est liée, pour chaque valeur mesurée, à l'incertitude de la mesure, à des variations de densité de sonde pour chaque spot ou à la variation d'incorporation séquence-spécifique entre les deux fluorochromes

Un filtre-seuil à 0.6 est imposé sur le Rf de chaque sonde afin de ne sélectionner uniquement que les mesures les plus reproductibles représentées en noir sur la Figure IV-7.

Cependant, quand $Rf \approx 1$ cela signifie que toutes les valeurs mesurées sont reproductibles ; le facteur de reproductibilité correspond alors à la moyenne des facteurs $Rf1$ et $Rf2$, où :

$$\text{si } Rt/Rx < 1 : Rf1 = Rt/Rx \quad \text{si } Rt/Rx > 1 : Rf1 = (Rt/Rx)^{-1}$$

$$\text{si } Rt.Rx < 1 : Rf2 = Rt.Rx \quad \text{si } Rt.Rx > 1 : Rf2 = (Rt.Rx)^{-1}$$

IV-4.2 b Calcul des rapports d'expression

Une fois que les valeurs d'expression Exp/Ref pour chaque hybridation ont été calculées, il reste à définir le niveau final d'expression Exp/Ref pour le *dye swap* (et pour chaque spot). On distingue plusieurs cas, en fonction des facteurs Rt et Rx :

- quand $Rt.Rx \approx 1$ et $Rt/Rx \neq 1$, l'erreur sporadique mesurée est due à la variation de la densité des sondes entre les deux lames du *dye swap* ; la valeur finale du niveau d'expression Exp/Ref correspond à la moyenne des valeurs $\text{Exp}_{\text{Cy5}}/\text{Ref}_{\text{Cy5}}$ et $\text{Exp}_{\text{Cy3}}/\text{Ref}_{\text{Cy3}}$ pondérée de la valeur $Rt.Rx$;
- quand $Rt.Rx \neq 1$ et $Rt/Rx \approx 1$, l'erreur sporadique mesurée découle du biais d'incorporation entre les fluorochromes Cy3 et Cy5, de telle sorte que la valeur finale du niveau d'expression Exp/Ref ne peut pas être calculée comme ci-dessus ; on la définit comme étant la moyenne des valeurs $\text{Exp}_{\text{Cy3}}/\text{Ref}_{\text{Cy5}}$ et $\text{Exp}_{\text{Cy5}}/\text{Ref}_{\text{Cy3}}$ pondérée de la valeur $Rt.Rx$;
- quand $Rt.Rx \approx 1$ et $Rt/Rx \approx 1$, toutes les mesures sont reproductibles, la valeur finale du niveau d'expression Exp/Ref est la moyenne des valeurs intra et inter-lames $\text{Exp}_{\text{Cy3}}/\text{Ref}_{\text{Cy3}}$, $\text{Exp}_{\text{Cy5}}/\text{Ref}_{\text{Cy5}}$, $\text{Exp}_{\text{Cy3}}/\text{Ref}_{\text{Cy5}}$ et $\text{Exp}_{\text{Cy5}}/\text{Ref}_{\text{Cy3}}$ pondérée de la valeur $Rt.Rx$;
- quand $Rt.Rx \neq 1$ et $Rt/Rx \neq 1$ les valeurs Exp/Ref sont éliminées

IV-4.2 c Normalisation

Une fois que les lames ont été validées c'est-à-dire pour $R_f \geq 0.6$, il s'agit de déterminer quels sont les gènes exprimés différemment entre deux conditions distinctes. Le rapport d'expression x/y , calculé pour chaque sonde et défini comme le rapport entre la mesure corrigée de l'expérience (x) et la mesure corrigée de la référence (y), informe normalement sur le niveau de modulation du gène. Toutefois, l'erreur commise sur une répression comprise entre $[0 ; 1]$ n'a pas la même dimension que celle commise sur une induction comprise entre $[1 ; +\infty]$. Pour donner aux erreurs, donc aux mesures, des dimensions comparables, nous calculons les modulations X comme $X = -\ln(y/x)$ pour une répression ($x < y$) et $X = \ln(x/y)$ pour une induction ($x > y$). L'ensemble des modulations d'expression X est alors organisé dans une matrice $N.P$, où **les lignes N** représentent les sondes et les **colonnes P** représentent les expériences (cas). Chaque ligne de la matrice correspond à des modulations de l'ensemble des expressions d'un gène entre les différentes expériences (assimilable à un point dans un espace à P dimensions). Pour éliminer le niveau de modulation de base des gènes, qui n'intervient pas pour l'analyse souhaitée, chaque profil est centré par rapport à sa moyenne. Cela permet alors d'analyser un gène donné entre toutes les conditions et de fixer un référentiel commun pour l'ensemble des profils.

L'analyse effectuée sur cette matrice dépend ensuite de la question posée. Dans le cas présent, nous recherchons les profils de gènes exprimés différemment entre deux conditions mais invariants pour une même condition. La difficulté est de minimiser le nombre de gènes présentant de tels profils par pur hasard et cela malgré le faible nombre relatif de répétitions de chaque expérience (trois cultures de cellules indépendantes pour chaque condition, sauf exception).

Un premier filtre, consistant à réaliser un t-test entre deux conditions, permet d'éliminer rapidement les gènes ne correspondant pas au profil souhaité. Le t-test permet de ne conserver que les gènes dont la moyenne d'expression diffère entre les deux conditions A et B. La limite d'élimination d'un gène est fixée automatiquement à partir d'un seuil calculé sur toutes les permutations possibles entre les deux conditions A et B.

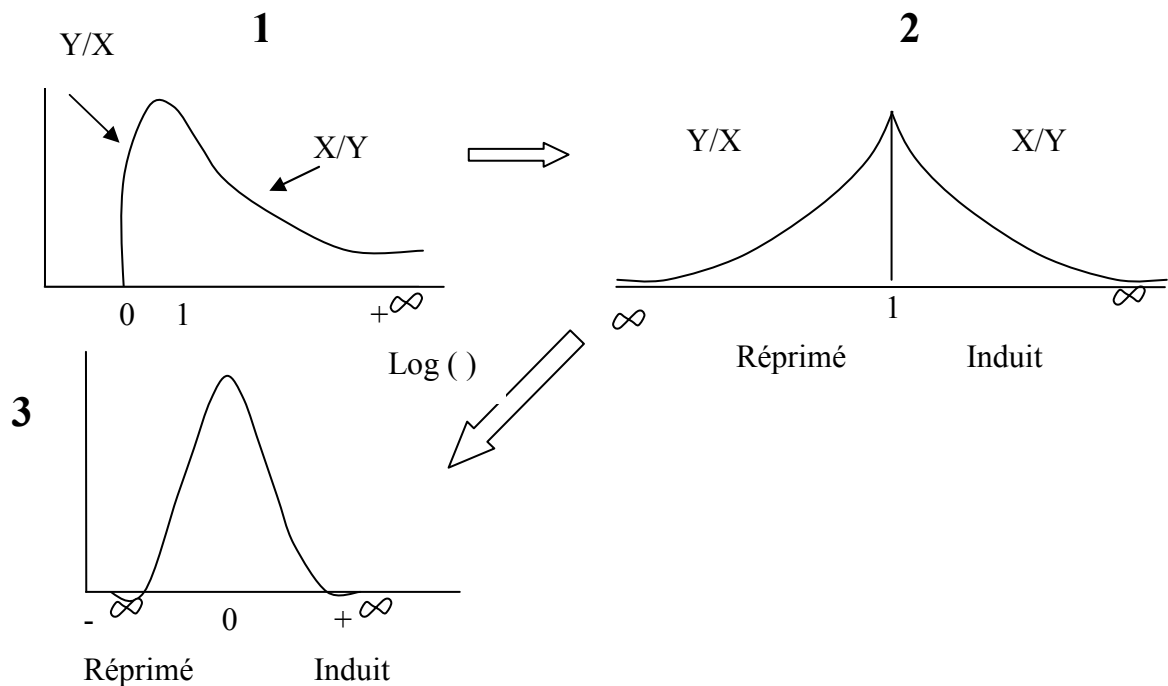
Toutefois, suite à ce premier tri, il reste un grand nombre de gènes de la condition A dont la moyenne des ratios d'expression est encore proche de la moyenne des ratios d'expression des gènes de la condition B. Pour évaluer ce nombre il est indispensable de disposer d'une loi de probabilité adaptée à la taille des échantillons analysés.

Afin de réaliser cela, les niveaux d'expression sont normalisés c'est-à-dire qu'ils sont réduits d'un espace $[-\infty, \infty]$ à un espace $[-1, 1]$ tel que :

$$X''_{i,j} = \frac{X'_{i,j}}{\sqrt{\sum_{j=1}^P X'^2_{i,j}}}$$

i et j représentent respectivement les index des lignes (gènes) et des colonnes (échantillons) de la matrice NP. X' est la valeur du niveau d'expression obtenu après centrage à la position (i,j) de la matrice.

Dans ce nouvel espace, les modulations dans une colonne de la matrice suivent une loi de distribution centrée sur 0 dont la densité de probabilité est connue en chaque point. Il devient alors possible de définir pour l'échantillon j la probabilité de trouver par hasard une modulation $X''_{i,j}$ dans un intervalle donné. Les étapes de normalisation décrites ci-dessus sont schématisées ainsi :



- 1) Les ratios d'expression X/Y sont calculés pour chaque sonde comme le rapport entre la mesure corrigée de l'expérience et la mesure corrigée de la référence. Sur $[0 ; 1]$ on considère le rapport X/Y et sur $[1 ; +\infty]$ on considère Y/X où X est l'expérience et Y la référence.

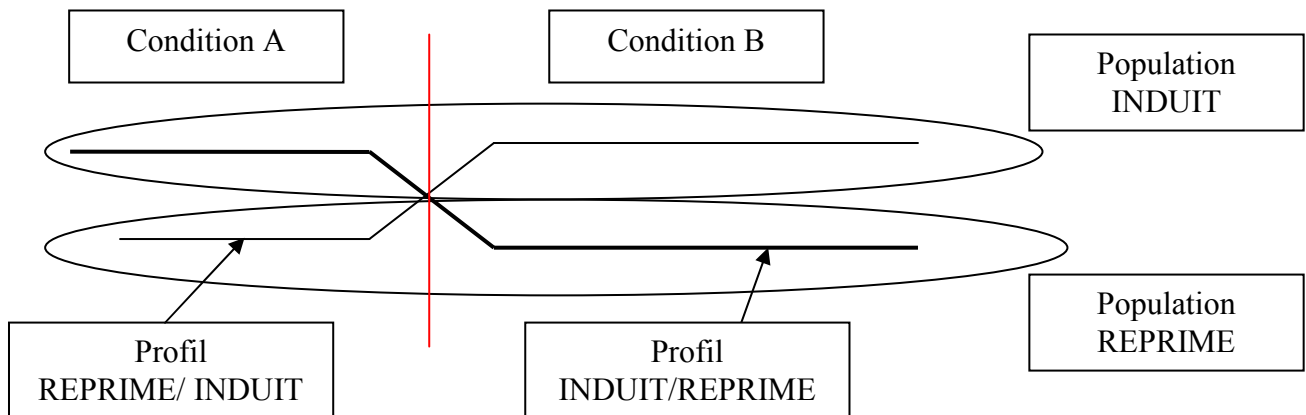
- 2) Les ratios de l'ensemble des expressions d'un gène sont alors centrés sur 1 ce qui permet d'analyser un gène donné, sans tenir compte de son niveau d'expression de base. Sur l'espace de $-\infty$ à 1, on considère le ratio Y/X et sur 1 à $+\infty$ on considère le ratio X/Y .
- 3) Pour manipuler et analyser les données, les ratios d'expression sont usuellement transformés dans une échelle logarithmique. Le logarithme permet de transformer le ratio d'expression en une fonction symétrique de $-\infty$ à $+\infty$, centrée sur 0 et additive, ce qui facilite les analyses statistiques. N'importe quelle base de logarithme peut être utilisée de manière équivalente.

IV-4.2 d Classement et ordonnancement des gènes

A l'aide de la loi de distribution des niveaux d'expression relatifs, il est possible de finement sélectionner les profils d'expression de gènes qui présentent une grande probabilité d'être différents entre les deux conditions A et B. A priori, si le t-test est significatif et si une signature qui différencie strictement les deux conditions A et B existe alors :

- 1) Parmi les gènes sélectionnés par les t-tests, il existe des profils i pour lesquels toutes les coordonnées $X''_{A,j}$ sont significativement différentes des coordonnées $X''_{B,j}$.
- 2) La population des rapports correspondants à des gènes induits est significativement différente de la population des gènes réprimés quelque soit la condition A ou B.

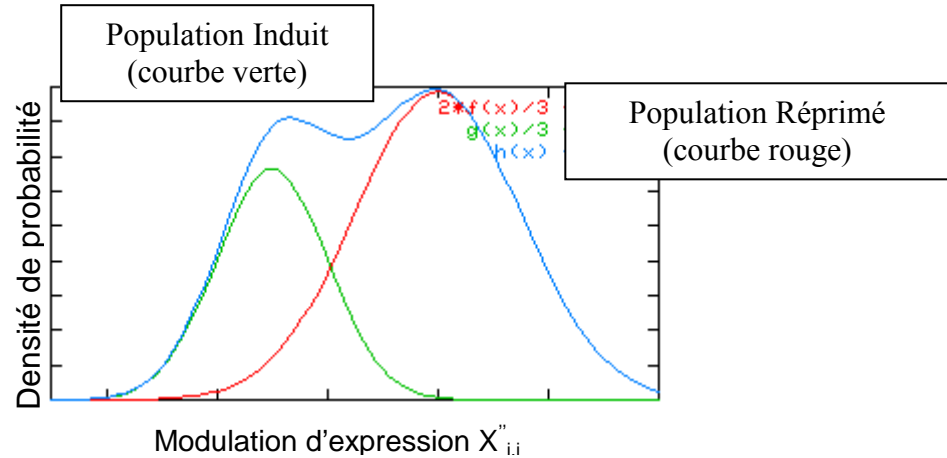
Ces deux propositions sont illustrées ci-dessous :



Quand la signature existe, on définit alors deux groupes de profils : les profils Réprimé/Induit et Induit/Réprimé.

Pour vérifier ces deux propositions nous recherchons s'il est possible de modéliser pour toutes les conditions, deux lois de distribution qui décrivent les populations induites $X''_{i,j} > 0$ et les populations réprimées $X''_{i,j} < 0$. Ce modèle est calculé à l'aide d'un algorithme d'estimation-

maximisation EM développé par N. Ugolin. La convergence de l'algorithme est réalisée par minimisation d'un RMS (*root mean square*) entre la fonction recalculée à partir des lois définies par l'algorithme EM et la distribution bimodale réelle (Figure ci-dessous courbe bleue).



A la convergence de l'algorithme EM, chaque modulation $X''_{i,j}$ correspondant à chaque coordonnée d'un gène donné dans la matrice, est attribuée à l'une ou l'autre des populations induit (courbe verte) ou réprimé (courbe rouge).

Finalement nous recherchons s'il existe des gènes (ligne de la matrice) pour lesquels il n'y a aucune contradiction entre les probabilités d'attribution de ces coordonnées (modulation d'expression $X''_{i,j}$) aux catégories induite ou réprimée, par l'algorithme EM et le profil induit-réprimé ou réprimé-induit défini par le t-test. Cette procédure permet d'évaluer automatiquement la cohérence des données sans avoir à définir arbitrairement un seuil de p -value.

IV-5 Résultats

IV-5.1 Vérification du phénotype

L'étude des transcrits impliqués dans la résistance au cadmium des cellules HZR et qui sont sélectionnés par le zinc, ainsi que les variations du transcriptome résultant d'un traitement au cadmium dans les cellules HZR, implique de s'assurer de l'existence effective du phénotype de protection contre le cadmium chez les cellules HZR dans les conditions et sur les échantillons utilisés pour cette étude transcriptomique. Il est également nécessaire de s'assurer de la réversibilité du phénotype des cellules HZR dont le zinc dans le milieu de culture a été enlevé pendant une semaine. Enfin, la résistance des cellules HZR vis-à-vis du cadmium et en présence de 100 μM de zinc a été testée afin de connaître l'effet additif du zinc sur la viabilité des cellules HZR en présence de cadmium avec des concentrations différentes de celles utilisées dans le Chapitre I.

La viabilité des cellules HZR vis-à-vis du cadmium a été mesurée pour chacune des trois conditions citées précédemment, après 24 heures d'exposition. Les viabilités ont été déterminées pour chacune des trois cultures indépendantes S1, S2, S3 correspondants a) aux cellules HZR maintenues dans 100 μM de zinc dans lesquelles le cadmium a remplacé le zinc au moment du stress, b) aux cellules HZR maintenues dans 100 μM de zinc au moment du stress cadmium et c) aux cellules HZR pour lesquelles le zinc est enlevé pendant une semaine et le cadmium est ensuite appliqué pendant 24 heures.

La mesure de viabilité de ces trois cultures indépendantes nous permettait également de vérifier la reproductibilité des phénotypes observés.

- Dans le cas des cellules HZR maintenues dans 100 μM de zinc, la substitution du zinc par le cadmium conduit à une CL_{50} comprise entre 155 et 190 μM de cadmium. Les cellules HZR sont donc bien résistantes vis-à-vis du cadmium en comparaison aux cellules HeLa (Figure IV-8a).
- La présence de 100 μM de zinc ne semble pas beaucoup modifier la CL_{50} des cellules HZR puisque celle-ci se situe entre 120 et 180 μM de cadmium après 24 heures d'exposition (Figure IV-8b).
- Pour les cellules HZR maintenues dans un milieu sans zinc pendant une semaine (HZR-Zn), la viabilité vis-à-vis du cadmium a fortement diminué pour les trois cultures indépendantes puisque la CL_{50} est autour de 30 μM (Figure IV-8c).

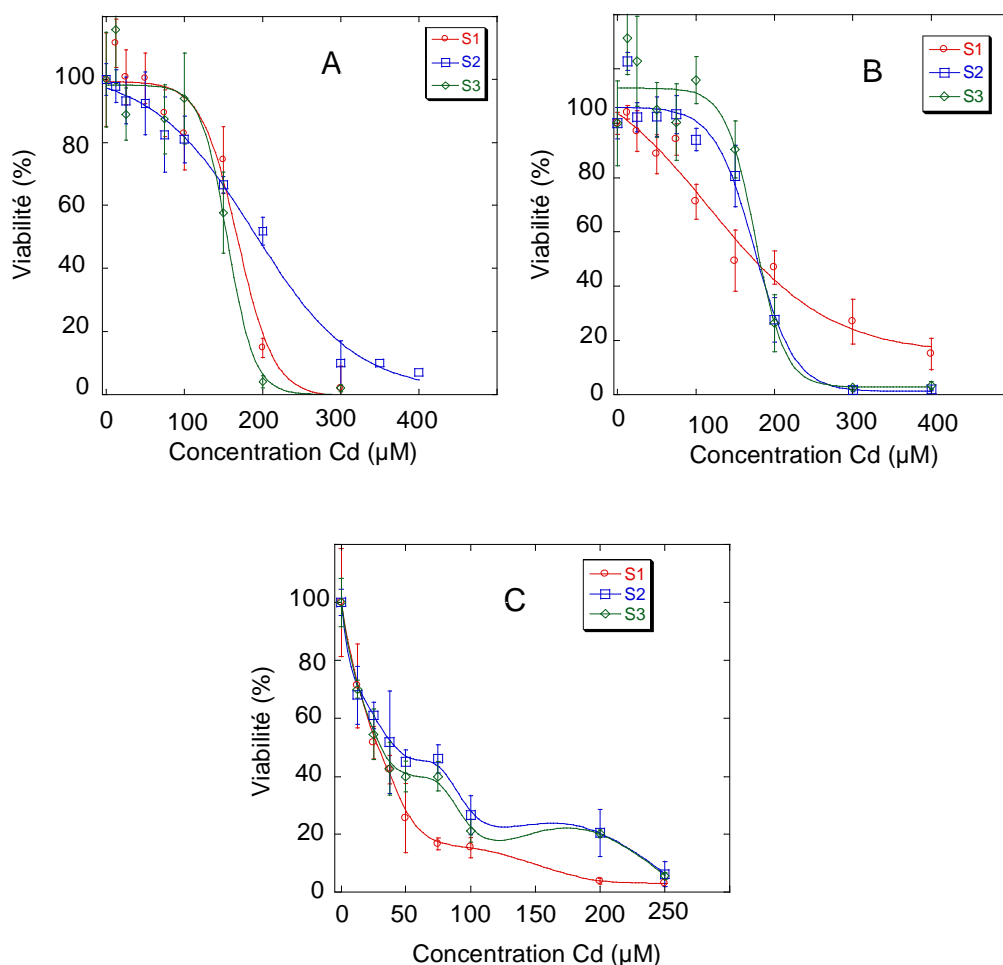


Figure IV-8 : Viabilité vis-à-vis du cadmium des cultures de cellules HZR utilisées pour les études transcriptomiques. Les cellules HZR ont été traitées avec des concentrations croissantes d'acétate de cadmium pendant 24 heures et ce aux mêmes nombres de passages que les cellules destinées à l'étude transcriptomique. (A) Les cellules HZR ont été maintenues dans 100 μM de zinc pendant 24 heures puis au moment de mesurer la viabilité, celui-ci a été substitué au cadmium. (B) Les mesures de viabilité ont été réalisées en conservant 100 μM de zinc dans le milieu et en ajoutant des concentrations croissantes de cadmium. (C) Les cellules HZR ont été maintenues pendant une semaine dans un milieu de culture sans zinc et les courbes de viabilité ont été réalisées en présence de concentrations de cadmium croissantes. La viabilité cellulaire a été mesurée par le test MTT. Les résultats sont reportés en pourcentage par rapport à l'absorbance à 560 nm des cellules viables non exposées au cadmium. Pour les courbes A et B, des courbes sigmoïdes rendent compte des données expérimentales avec un coefficient de corrélation de 0.98 au minimum. Les concentrations de cadmium pour lesquelles 50% des cellules restent viables (CL_{50}) sont les suivantes :

	HZR + Cd			HZR+ 100 μM Zn + Cd		
Echantillons	S1	S2	S3	S1	S2	S3
CL_{50}	168 ± 10	188 ± 11	155 ± 10	116 ± 40	176 ± 10	174 ± 8

Les mesures résultent d'une seule culture avec 8 points mesurés pour une même concentration de cadmium.

IV-5.2 Définitions

Les ARN totaux provenant de chaque condition de traitement ainsi que de chaque culture indépendante S1, S2 et S3 ont été traités et hybridés séparément. Au terme de la série d'hybridations sur puces et après les différentes procédures de traitement des données présentées précédemment, nous obtenons un tableau où figurent les niveaux d'expression relatifs à la référence commune utilisée. Comme précédemment défini au paragraphe IV-3.1, dans tout ce qui suit, la condition T0 correspond aux cellules HZR dans lesquelles 100 μ M de zinc ont remplacé la concentration initiale de 200 μ M pendant 24 heures, la condition T24 correspond aux cellules HZR en présence de 100 μ M de zinc pendant 48 heures. La condition T0T24 est obtenue pour les gènes communs (non différentiellement exprimés) entre les conditions T0 et T24. La condition Zn+Cd+ signifie que les cellules ont été incubées pendant 24 heures dans 100 μ M de zinc et 100 μ M de cadmium et enfin la condition Cd+ correspond aux cellules mises en présence de 100 μ M de cadmium pendant 24 heures.

Les gènes invariants pour les conditions T0 et T24 et pour les trois cultures indépendantes ont été confrontés aux gènes invariants entre trois (ou 5 pour Cd+) autres cultures indépendantes S1, S2 et S3 pour une autre condition, comme par exemple après avoir enlevé le zinc pendant une semaine. Les valeurs sont exprimées en logarithme, ainsi les gènes dont les signes sont négatifs sont réprimés et ceux dont les valeurs sont positives sont induits.

IV-5.3 Détermination des gènes variants et invariants

Sur les trois cultures indépendantes utilisées pour chaque condition, la procédure d'analyse telle que déterminée précédemment nous a permis de retenir 19028 sondes bien mesurées dans les conditions T0 et T24, 16736 dans la condition Cd+Zn+, 17570 dans la condition Cd+ et 14574 dans celle -Zn.

Les gènes de la condition T0T24, qui ont été confrontés à d'autres conditions, sont des gènes déterminés comme invariants entre la condition T0 et la condition T24 : ceci contribue à s'affranchir des variations de niveaux d'expression liées à des paramètres non associés à la manipulation des métaux, comme par exemple lors du déroulement du cycle cellulaire, puisque les cellules de ces cultures non phasées se divisent entre T0 et T24. Par application du filtre le plus sélectif décrit dans la partie analyse, nous avons identifié 67 gènes différentiellement exprimés entre la condition T0T24 et la condition -Zn dont 43 non indécis. Nous avons également déterminé 160 gènes différentiellement exprimés entre les conditions

T0T24 et Cd+Zn+ dont 99 non indécis et enfin 191 gènes entre les conditions T0T24 et Cd+ dont 56 non indécis. Ce sont ces ensembles de gènes qui fournissent la base de l'analyse qui suit.

IV-5.3 a Gènes différentiellement exprimés

L'ensemble des gènes annotés, différentiellement exprimés (c'est-à-dire dérégulés entre deux conditions) sont représentés dans le tableau IV-1. A des fins de lisibilité et de simplification, seules les valeurs pour lesquelles il n'y a aucune contradiction entre les probabilités d'attribution des ratios d'expression d'un gène dans une catégorie induite ou réprimée, comme présenté dans la méthode d'analyse précédemment décrite, sont indiqués dans le tableau. Cependant, lors de l'analyse des gènes nous en avons repérés quelques uns qui pouvaient intervenir dans des processus de régulation et qui pourtant étaient mentionnés comme « indécis ». Ces gènes ont été retenus et sont repérables dans le tableau grâce à une astérisque précédant le nom du gène. Ils ont été qualifiés comme indécis, car ce sont les gènes pour lesquels l'hypothèse de non contradiction n'a pas été respectée une seule fois (sur une lame) dans l'ensemble des conditions analysées. Cela signifie que l'expression d'un gène donné pour la condition T0T24, correspondant à la moyenne pour les conditions individuelles T0S1, T0S2, T0S3, T24S1, T24S2 et T24S3, est différente de l'expression de ce gène pour la condition -Zn qui correspond à la moyenne des expressions de chacune des conditions -ZnS1, -ZnS2 et -ZnS3, mais que la valeur d'expression du gène pour une même condition, par exemple -Zn est très faiblement induite ou réprimée entre -ZnS1 et -ZnS2. Ainsi dans le tableau figurent les moyennes des valeurs d'expression de chaque gène pour une condition donnée, T0T24, Cd+, Cd+Zn+ ou -Zn. Les valeurs d'expression des gènes précédées d'un signe négatif sont moins exprimées par rapport à la référence (mélange d'ARN de plusieurs lignées humaines, voir IV-3.1 a) pour la condition considérée et inversement. Les gènes en gras ou italiques, sont ceux qui apparaissent dans des voies biologiques définies dans le logiciel Ingenuity® Systems et qui seront présentés ultérieurement.

Les gènes figurant en **gras sont surexprimés pour la condition T0T24** par rapport à l'autre condition et ceux figurant en *italique sont réprimés pour la condition T0T24* par rapport à tout autres conditions. Les gènes communs entre les pathways sont notés :

gene* condition1*condition2

Gènes différentiellement exprimés entre la condition T0T24 vs -Zn

Nom	Definition dans la banque d'Ocimum	Référence	Moyenne T0T24	Moy -Zn	Moy Cd+Zn+	MoyCd+
GENES PATHWAY 1: condition T0T24 vs -Zn						
CD22 ^{*Cd+}	CD22 molecule: similar to B-cell receptor CD22 precursor (Leu-14) (B-lymphocyte cell adhesion molecule) (BL-CAM) (Siglec-2)	NM_001771	1,02	-1,80		
UPP1 ^{*Zn+Cd+}	Uridine phosphorylase 1	BC007348	0,94	-1,82		
IL13RA1	Interleukin 13 receptor, alpha 1	Y10659	0,47	-0,96		
PRM1	Protamine 1	BU854638	0,47	-0,77		
STK10	Serine/threonine kinase 10	NM_005990	1,09	-1,83		
<i>MIA</i>	<i>RAB4B, member RAS oncogene family</i>	<i>NM_016154</i>	<i>-0,42</i>	<i>0,78</i>		
<i>* GNA15</i>	<i>Nicalin homolog (zebrafish) / Guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha 15 (Gq class)</i>	<i>AB209067</i>	<i>-0,14</i>	<i>0,28</i>		
<i>* AKNA</i>	<i>AT-hook transcription factor</i>	<i>AK160382</i>	<i>-0,12</i>	<i>0,24</i>		
<i>* CTSC</i>	<i>Cathepsin C (cysteine peptidase)</i>	<i>BX537913</i>	<i>-0,19</i>	<i>0,41</i>		
<i>* CREM</i>	<i>cAMP responsive element modulator</i>	<i>AF069065</i>	<i>-0,17</i>	<i>0,38</i>		
<i>* PRPF40A</i>	<i>PRP40 pre-mRNA processing factor 40 homolog A</i>	<i>XM_931099</i>	<i>-0,29</i>	<i>0,37</i>		
<i>* ARID4A</i>	<i>AT rich interactive domain 4A (Retinol binding protein 1-like)</i>	<i>NM_002892</i>	<i>-0,31</i>	<i>0,35</i>		
<i>* DCP1A</i>	<i>DCP1 decapping enzyme homolog A</i>	<i>AJ275986</i>	<i>-0,33</i>	<i>0,43</i>		
<i>* TSEN2</i>	<i>tRNA splicing endonuclease 2 homolog (S. cerevisiae)</i>	<i>AK027821</i>	<i>-0,17</i>	<i>0,37</i>		
GENES PATHWAY 2: condition T0T24 vs -Zn						
GGCX	Gamma-glutamyl carboxylase	NM_000821	1,00	-1,63		
COL1A1	Collagen, type I, alpha 1	Z74615	0,84	-1,77		
PDRG1	P53 and DNA damage regulated 1	BM913118	0,98	-2,22		
<i>KIF20A</i>	<i>Kinesin family member 20A</i>	<i>AK025790</i>	<i>-0,46</i>	<i>1,26</i>		
<i>PTCD3</i>	<i>Pentatricopeptide repeat domain 3</i>	<i>NM_017952</i>	<i>-0,36</i>	<i>1,21</i>		
<i>LANCL1</i> ^{*Cd+}	<i>LanC lantibiotic synthetase component C-like 1 (bacterial)</i>	<i>NM_006055</i>	<i>-0,46</i>	<i>0,84</i>		
<i>RNASEN</i>	<i>Ribonuclease III, nuclear</i>	<i>AB209501</i>	<i>-0,26</i>	<i>0,69</i>		
<i>SPAG16</i>	<i>Sperm associated antigen 16</i>	<i>CR749477</i>	<i>-0,33</i>	<i>0,72</i>		
<i>AMD1</i>	<i>Adenosylmethionine decarboxylase 1</i>	<i>BX640599</i>	<i>-0,37</i>	<i>0,45</i>		
<i>ITGA3</i>	<i>Integrin alpha3</i>	<i>AB209658</i>	<i>-0,32</i>	<i>0,50</i>		
<i>* LARS</i>	<i>Leucyl-tRNA synthetase</i>	<i>NM_020117</i>	<i>-0,14</i>	<i>0,28</i>		
<i>* TFB1M</i>	<i>Transcription factor B1, mitochondrial</i>	<i>BM465245</i>	<i>-0,23</i>	<i>0,46</i>		
<i>* RFX5</i>	<i>Regulatory factor X, 5 (influences HLA class II expression)</i>	<i>NM_000449</i>	<i>-0,30</i>	<i>0,34</i>		

Chapitre 4 : Etude de l'effet du cadmium et du zinc sur la réponse transcriptionnelle des cellules HZR

GENES PATHWAY 3: condition T0T24 vs -Zn						
OCN	Occludin	NM_002538	1,92	-2,28		
ESR2	Estrogen receptor 2 (ER beta)	AB006589	1,06	-1,69		
FXD2	FXD domain containing ion transport regulator 2	AF491813	1,37	-2,75		
ELF5 ^{*Cd+}	E74-like factor 5 (ets domain transcription factor)	NM_198381	0,97	-1,61		
NUP50	Nucleoporin 50kDa	NM_007172	0,82	-1,70		
SERPINA6 ^{*Cd+ *Cd+Zn+}	Serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 6	BC036818	0,55	-1,12		
MUC16	Mucin 16, cell surface associated	AF414442	-0,99	1,79		
PLD2	Procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2	NM_182943	-0,54	0,94		
CASP8AP2	CASP8 associated protein 2	AB037736	-0,48	0,89		
BCL2L12	BCL2-like 12 (proline rich)	NM_138639	-0,34	0,75		
* GPR143 ^{*Cd+}	G protein-coupled receptor 143	BC068977	-0,25	0,50		
GENES NE RENTRANT PAS DANS LES PATHWAYS						
OPCML	Opioid binding protein/cell adhesion molecule-like	NM_001012393	1,66	-3,61		
WIBG	Within bgcn homolog (Drosophila)	BC006135	1,80	-3,14		
XM_041081_1	NifU-like N-terminal domain containing	NM_014301	1,61	-2,84		
NM_018605_1	NM_022118.3	BX648672	1,01	-1,96		
GET1_HUMAN	Genethonin 1	CR627383	0,94	-1,96		
KCNK7	Potassium channel, subfamily K, member 7	NM_005714	0,66	-1,83		
CXorf15	Chromosome X open reading frame 15	AY739713	0,75	-1,69		
ARMCX5	GPRASP2: G protein-coupled receptor associated sorting protein 2	NM_014710	0,30	-0,54		
RARSL	arginyl-tRNA synthetase-like	XM_035819_1	-0,91	0,73		
IFT81	Intraflagellar transport 81 homolog (Chlamydomonas)	AF332010	-0,53	1,09		
GPR125	G protein-coupled receptor 125	NM_145290	-0,40	0,80		
CHST12	Carbohydrate (chondroitin 4) sulfotransferase 12	BC015954	-0,34	0,83		
LOC145786	hypothetical protein LOC145786	XM_096860_1	-0,32	0,69		
GRP124 ^{*Cd+}	G protein-coupled receptor 124	NM_032777_1	-0,45	0,53		
RAD54L2	RAD54L2	BC001474_1	-0,28	0,63		
NM_014486_1	V-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)	AJ606319	-0,26	0,62		
PDGFR	NP_006198.1 – platelet-derived growth factor-beta-like	NM_006207	-0,25	0,55		

Gènes différentiellement exprimés entre la condition T0T24 vs Zn+Cd+

Nom	Definition dans la banque d'Ocimum	Référence	Moyenne T0T24	Moy -Zn	Moy Cd+Zn+	MoyCd+
GENES PATHWAY 1: condition T0T24 vs Cd+Zn+						
CRAT	carnitine acetyltransferase is a key enzyme in the metabolic pathway in mitochondria, peroxisomes and endoplasmic reticulum. CRAT catalyzes the reversible transfer of acyl groups from an acyl-CoA thioester to carnitine and regulates the ratio of acylCoA/CoA	NM_000755	0,66		-0,67	
SERPINA6* Cd+*Zn-	serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 6	BC036818	0,37		-0,72	
BTF3	basic transcription factor 3 (RNA polymerase B transcription factor 3).	BQ923254	0,39		-0,62	
* HUNK	hormonally upregulated Neu-associated kinase	AJ271722	0,14		-0,48	
* STX4	Syntaxin 4	CR590461	0,22		-0,34	
COL10A1	<i>collagen, type X, alpha 1</i>	<i>NM_000493</i>	<i>-0,81</i>		<i>1,39</i>	
THBS3	<i>thrombospondin 3</i>	<i>NM_007112</i>	<i>-0,62</i>		<i>1,66</i>	
LRRC7	<i>Leucine rich repeat containing 7</i>	<i>BX648943</i>	<i>-0,26</i>		<i>0,53</i>	
SLC13A1	<i>solute carrier family 13 (sodium / sulfate symporters), member 1</i>	<i>AF260824</i>	<i>-0,27</i>		<i>0,46</i>	
SLC26A2	<i>solute carrier family 26 (sulphate transporter), member 2</i>	<i>NM_000112</i>	<i>-0,30</i>		<i>0,42</i>	
* PVALB	<i>Parvalbumin The protein encoded by this gene is a high affinity calcium ion-binding protein that is structurally and functionally similar to calmodulin and troponin C.</i>	<i>AA203126</i>	<i>-0,30</i>		<i>0,34</i>	
* SLC01B3	<i>solute carrier organic anion transporter family, member 1B3</i>	<i>NM_019844</i>	<i>-0,17</i>		<i>0,36</i>	
*CHRD	<i>Chordin</i>	<i>AF209930</i>	<i>-0,16</i>		<i>0,42</i>	
GENES PATHWAY 2: condition T0T24 vs Cd+Zn+						
MT1G	metallothionein 1G	BC048334	0,33		-0,63	
BCL2L11	BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)	BC033694	0,26		-0,44	
DOK1	docking protein 1, 62kDa (downstream of tyrosine kinase 1)	AK055944	0,58		-0,88	
HTATIP	HIV-1 Tat interacting protein, 60kDa	NM_182710	0,39		-0,43	
DEFB103A	Defensin	NM_018661	0,46		-0,72	
HD	<i>huntingtin (Huntington disease)</i>	<i>NM_002111</i>	<i>-0,42</i>		<i>0,51</i>	
LPIN3	<i>Lipin 3</i>	<i>NM_022896</i>	<i>-0,52</i>		<i>1,30</i>	
* PTH	<i>Parathyroid hormone</i>	<i>NM_000315</i>	<i>-0,16</i>		<i>0,28</i>	
* PTHLH	<i>Parathyroid hormone-like hormone</i>	<i>J03580</i>	<i>-0,21</i>		<i>0,36</i>	
* IHPK1	<i>Inositol hexaphosphate kinase 1</i>	<i>NM_153273</i>	<i>-0,12</i>		<i>0,37</i>	
* EYA2	<i>Eyes absent homolog 2 (Drosophila)</i>	<i>AL833552</i>	<i>-0,29</i>		<i>0,41</i>	
*TP53I11	<i>Tumor protein p53 inducible protein 11</i>	<i>NM_006034</i>	<i>-0,18</i>		<i>0,32</i>	

Chapitre 4 : Etude de l'effet du cadmium et du zinc sur la réponse transcriptionnelle des cellules HZR

GENES PATHWAY 3: condition T0T24 vs Cd+Zn+						
HLA-DPB1	major histocompatibility complex, class II, DP beta 1	AY375797	0,53		-0,65	
WAC	WW domain containing adaptor with coiled-coil	AL161936	0,32		-0,79	
*POLL	polymerase (DNA directed), lambda	NM_013274	0,17		-0,30	
*CA9	carbonic anhydrase IX	BC014950	0,21		-0,38	
ISG15	ISG15 ubiquitin-like modifier	NM_005101	-0,83		0,35	
MAFB	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B (avian)	NM_005461	-0,31		0,62	
TRIM5	tripartite motif-containing 5	BX647152	-0,30		0,46	
TFRC	transferrin receptor (p90, CD71)	NM_003234	-0,43		0,71	
EMR1	Egf-like module containing, mucin-like, hormone receptor-like 1	NM_001974	-0,31		0,49	
*ERCC1	Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1 (includes overlapping antisense sequence)	AK092039	-0,22		0,45	
*HOXA5	Homeobox A5: Methylation of this gene may result in the loss of its expression and, since the encoded protein upregulates the tumor suppressor p53, this protein may play an important role in tumorigenesis.	NM_153631	-0,09		0,41	
*SEC61G	Sec61 gamma subunit	CB992038	-0,17		0,19	
GENES PATHWAY 4: condition T0T24 vs Cd+Zn+						
RBBP9	Retinoblastoma binding protein 9 The protein may play a role in the regulation of cell proliferation and differentiation.	BC015938	0,47		-0,79	
MPHOSPH9	M-phase phosphoprotein 9	AK096541	0,36		-0,63	
LAMA5	laminin, alpha 5	NM_005560	0,32		-0,43	
BCL7A	B-cell CLL/lymphoma 7A	X89984	0,43		-0,51	
PHLPP	PH domain and leucine rich repeat protein phosphatase	AB011178	0,29		-0,57	
EMX2	Empty spiracles homolog 2 (Drosophila)	NM_004098	0,27		-0,57	
STRN4	striatin, calmodulin binding protein 4	NM_001039877	0,27		-0,55	
GGT1	Gamma-glutamyltransferase 1	J05235	-0,12		0,81	
LIPG	This protein is designated a member of the TG lipase family by its sequence and characteristic lid region which provides substrate specificity for enzymes of the TG lipase family.	NM_006033	-0,48		0,41	
GLP2R	glucagon-like peptide 2 receptor	NM_004246	-0,40		0,77	
*PTHLH	Parathyroid hormone-like hormone	J03580	-0,21		0,36	
GENES PATHWAY 5: condition T0T24 vs Cd+Zn+						
PIP3-E	Phosphoinositide-binding protein PIP3-E	NM_015553	0,24		-0,70	
DNAJB2	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 2	NM_006736	0,28		-0,43	
UPP1 ^{*Zn-}	uridine phosphorylase 1	BC001405	0,47		-0,65	
*EDG4	endothelial differentiation, lysophosphatidic acid G-protein-coupled receptor, 4	AK123043	0,20		-0,33	

Chapitre 4 : Etude de l'effet du cadmium et du zinc sur la réponse transcriptionnelle des cellules HZR

TRPC4AP	Transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 4 associated protein	AL096738	-0,33		0,70	
ANKS1A	ankyrin repeat and sterile alpha motif domain containing 1A	NM_015245	-0,37		0,54	
NEK1	NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase 1	AL050385	-0,24		0,66	
* TNFRSF8	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 8	NM_001243	-0,23		0,49	
*GLA	galactosidase, alpha	NM_000169	-0,14		0,30	
* PTHLH	Parathyroid hormone-like hormone	J03580	-0,21		0,36	
GENES NE RENTRANT PAS DANS LES PATHWAYS						
RIMS3	regulating synaptic membrane exocytosis 3, Rab-3 interacting molecule 3	D87074	-1,03		1,86	
AF113013	Homo sapiens PRO0806 mRNA, complete cds	NM_014084	-0,77		2,00	
PRO1596	Protein PRO1596	AF119915.1	-0,53		1,50	
FCRLM1	Fc receptor-like and mucin-like 1 precursor	BX649184	-0,71		1,18	
KRTAP1-5	Keratin-associated protein 1-5	AJ406928	-0,73		1,10	
NARG2	NMDA receptor-regulated gene 2	NM_024611	-0,46		1,36	
TBX10	T-box protein 10 : facteur de transcription Tbx10	AF033579	-0,56		1,22	
MTA3	metastasis associated 1 family, member 3	AL161954	-0,54		0,95	
GRK4	G protein-coupled receptor kinase 4	NM_005307	-0,46		0,87	
	Homo sapiens chromosome 16 clone RP11-455I19, complete sequence	AC136948	-0,34		0,94	
	Homo sapiens BAC clone RP11-275G7 from 2, complete sequence	AC017028	-0,32		0,93	
RBED1	RNA binding motif and ELMO/CED-12 domain 1	NM_032213	-0,39		0,84	
CML2	N-acetyltransferase 8 (camello like), inhibits NFkB activation, also morphology(?)	NM_016347	-0,32		0,90	
MYCN	v-myc myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived (avian)	AJ242956	-0,34		0,50	
CLEC2D	C-type lectin domain family 2, member D	BC040884	-0,26		0,87	
	Homo sapiens cDNA FLJ13050 fis, clone NT2RP3001432	AK023112	-0,36		0,73	
GBA3	glucosidase, beta, acid 3 (cytosolic)	AF317840	-0,43		0,64	
GPR61	G protein-coupled receptor 61	AB209096	-0,36		0,69	
BAZ2B	Bromodomain adjacent to zinc finger domain, 2B	NM_013450	-0,32		0,72	
ZNF672	zinc finger protein 672	BC035140	-0,29		0,73	
XM_097017_1	Homo sapiens genomic DNA; cDNA DKFZp586C2020 (from clone DKFZp586C2020)	AL050145	-0,43		0,55	
NM_014833_1	WBSCR20C	AF416611	-0,33		0,63	
SPTLC2	serine palmitoyltransferase, long chain base subunit 2	NM_004863	-0,28		0,63	
	chromosome 6 open reading frame 79	NM_022102	-0,45		0,45	
ZNF502	zinc finger protein 502	XM_084125_1	-0,22		0,66	
LUZP4	leucine zipper protein 4	NM_016383	-0,30		0,56	

Chapitre 4 : Etude de l'effet du cadmium et du zinc sur la réponse transcriptionnelle des cellules HZR

TRIM55	tripartite motif-containing 55	AK091728	-0,29		0,55	
OR10C1	olfactory receptor, family 10, subfamily C, member 1	NM_013941	-0,30		0,54	
XM_004891_1	Homo sapiens chromosome 15 clone RP11-386M24, complete sequence	AC012478	-0,29		0,54	
MANSC1	MANSC domain containing 1	BC032998	-0,27		0,55	
WDSOF1	WD repeats and SOF1 domain containing	XM_039177	-0,58		0,23	
CENTG2	WD repeat domain 43	D26488	-0,23		0,56	
CHD6	Chromodomain helicase DNA binding protein 6 The encoded protein, which is a member of the SNF2/RAD54 helicase family, contains two chromodomains, a helicase domain, and an ATPase domain.	XM_029763	-0,29		0,47	
EFNA5	Ephrin-A5	AK130248	-0,14		0,61	
PDCD2	programmed cell death 2	NM_002598	0,50		-0,766	
DSCAML1	Down syndrome cell adhesion molecule like 1	NM_020693	-0,19		0,54	
WDSOF1	WD repeats and SOF1 domain containing	XM_039177	-0,58		0,23	
KIAA0174	Putative MAPK-activating protein PM28, ER-Golgi intermediate compartment	BC103745	0,85		-1,69	
CYB5R1	cytochrome b5 reductase 1, NADH-quinone oxidoreductase type 3 polypeptide A2, disruption may cause methemoglobinaemia	AK123705	0,64		-1,10	
	centaurin, gamma 2 belongs to an ADP-ribosylation factor GTPase-activating (ARF-GAP) protein family involved in membrane traffic and actin cytoskeleton dynamics	AK127068	0,25		-0,45	
KIAA0280	Removed	XM_370635	0,33		-1,02	
SYNGR2	synaptogyrin 2	NM_004710	0,46		-0,80	
PDCD2	Programmed cell death 2	AK094428	0,50		-0,77	
TLR6	toll-like receptor 6	NM_003263	0,27		-0,63	
TBC1D23	hypothetical protein FLJ11046, TBC1 domain family, member 23	BC020955	0,43		-0,73	
PRMT6	Protein arginine N-methyltransferases	AY043278	0,44		-0,68	
C7orf26	chromosome 7 open reading frame 26	BM558459	0,40		-0,69	
SLC26A8	chloride/sulfate exchange plasma membrane	AK122928	0,30		-0,69	
NSUN5	NOL1/NOP2/Sun domain family, member 5	XM_932339	0,23		-0,75	
RANBP9	RAN binding protein 9 expression occurs in Hela cells	BX647552	0,33		-0,62	
RUTBC1	RUN and TBC1 domain containing 1	NM_014853	0,39		-0,52	
C1orf43	chromosome 1 open reading frame 43	AK022028	0,34		-0,55	
KIAA0286		AL833311	0,31		-0,55	
MPP2	membrane protein, palmitoylated 2 (MAGUK p55 subfamily member 2)	BC030287	0,31		-0,52	
RTBDN	Retbindin	AK093672	0,32		-0,51	
C5orf5	chromosome 5 open reading frame 5	AF251038	0,26		-0,55	
VPS13D	vacuolar protein sorting 13 homolog D (S. cerevisiae) In yeast, vacuolar-protein-sorting-13 proteins are involved in trafficking of membrane proteins between the trans-Golgi network and the prevacuolar compartment.	NM_015378	0,27		-0,48	
RAVER2	ribonucleoprotein, PTB-binding 2 Unknown	NM_018211	0,22		-0,46	

Gènes différentiellement exprimés entre la condition T0T24 vs Cd+

Nom	Definition dans la banque d'Ocimum	Référence	Moyenne T0T24	Moy -Zn	Moy Cd+Zn+	MoyCd+
GENES PATHWAY 1: condition T0T24 vs Cd+						
* TP73	tumor protein p73, metal binding	NM_005427	2,14			-1,04
* CD22* ^{Zn-}	CD22 molecule	NM_001771	2,13			-1,88
* UTRN	utrophin: similar to dystrophin, interact with dystroglycan protein	NM_007124	1,58			-1,82
* SLC12A9	solute carrier family 12 (potassium/chloride transporters), member 9; may associate with CPSF4 cleavage and polyadenylation specific factor 4	AK024466	2,47			-1,24
MLYCD	malonyl-CoA decarboxylase	NM_012213	-1,74			1,61
CASP9	caspase 9, apoptosis-related cysteine peptidase	AB209147	-0,64			0,68
NR3C1	Nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1 (glucocorticoid receptor). The protein encoded by this gene is a receptor for glucocorticoids and can act as both a transcription factor and a regulator of other transcription factors.	NM_001018077	-0,43			0,35
PDE4A	cAMP specific phosphodiesterase 4A variant pde46 (PDE4A) gene, exon 15 and 15a and alternative splice products, complete cds	AF069491	-0,39			0,49
EPOR	erythropoietin receptor	X97671	-0,26			0,24
* FYN	FYN oncogene related to SRC, FGR, YES This gene encoded a membrane-associated tyrosine kinase that has been implicated in the control of cell growth. The protein associates with the p85 subunit of phosphatidylinositol 3-kinase and interacts with the fyn-binding protein.	BX537571	-0,75			0,43
* ERRF1	ERBB receptor feedback inhibitor 1	AK096149	-0,78			0,61
* MYBPH	Myosin binding protein H	BC044226	-0,15			0,60
* AGTR1	angiotensin II receptor, type 1	NM_031850	-0,19			0,21
* PACS1	phosphofurin acidic cluster sorting protein 1	NM_018026	-0,41			0,32
* RGS2	regulator of G-protein signalling 2, 24kDa	BC042755	-0,43			0,40
* BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2	NM_000633	-0,37			0,35
* HSPA6	heat shock 70kDa protein 6 (HSP70B')	AB209585	-0,60			0,52
* BIRC5	baculoviral IAP repeat-containing 5	NM_001012271	-0,82			0,61
* PPM1J	protein phosphatase 1J (PP2C domain containing)	NM_005167	-0,45			0,58
GENES PATHWAY 2: condition T0T24 vs Cd+						
* ELF5* ^{Zn-}	E74-like factor 5 (ets domain transcription factor)	NM_198381	1,58			-1,45
* SPIB	Spi-B transcription factor, members of a subfamily of ETS, bind to a purine-rich sequence, the PU box	BQ061801	2,01			-1,53
* MPP2	membrane protein, palmitoylated 2 (MAGUK p55 subfamily member 2)	BC030287	1,69			-1,40
* PCGF6	polycomb group ring finger 6	AK027885	1,71			-1,37
TRERF1	transcriptional regulating factor 1 This gene encodes a zinc-finger transcriptional regulating protein which interacts with CBP/p300 to regulate the	AF297872	-0,40			0,40

Chapitre 4 : Etude de l'effet du cadmium et du zinc sur la réponse transcriptionnelle des cellules HZR

	human gene CYP11A1.					
MAST1	microtubule associated serine/threonine kinase 1	AB023190	-0,52			0,31
SH2B3	SH2B adaptor protein 3 (Lymphocyte adaptor protein)	AF055581	-0,26			0,28
* LRCH4	Leucine-rich repeats and calponin homology (CH) domain containing 4	NM_002319	-0,33			0,28
* KRT33B	Keratin, hair, acidic, 3B	BC009971	-0,26			0,41
* APOBEC2	Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 2	BC047767	-0,28			0,38
* CBR1	Carbonyl reductase 1	BM810059	-0,12			0,14
* STAG3	stromal antigen 3	AJ007798	-0,22			0,27
* MYCT1	Myc target 1	BC022556	-0,27			0,51
* TAPBP	TAP binding protein (tapasin) This gene encodes a transmembrane glycoprotein which mediates interaction between newly assembled major histocompatibility complex (MHC) class I molecules and the transporter associated with antigen processing (TAP), which is required for the transport of antigenic peptides across the endoplasmic reticulum membrane.	NM_003190	-0,38			0,30
* FOLH1	folate hydrolase (prostate-specific membrane antigen) 1	AF107214	-0,46			0,47
* SUGT1	Homologous to SGT1, suppressor of G2 allele of SKP1 (S. cerevisiae)	AY271314	-0,80			0,65
* PTPRR	protein tyrosine phosphatase, receptor type, R	NM_002849	-0,32			0,38
* GPR124 ^{*Zn-}	G protein-coupled receptor 124	NM_032777	-0,23			0,23
GENES PATHWAY 3: condition T0T24 vs Cd+						
ANKRA2	ankyrin repeat, family A (RFXANK-like), 2	NM_023039	1,99			-1,76
* SERPINA6 ^{*Zn+ Cd+ *Zn-}	serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antitrypsin), member 6	BC036818	1,18			-0,84
* CPEB1	cytoplasmic polyadenylation element binding protein 1, activates dormant mRNA	BQ719389	2,17			-1,63
* CDC27	cell division cycle 27	S78234	0,75			-0,87
* CLCA1	chloride channel, calcium activated member 1, may be involved with mucin synthesis	AF039400	1,89			-1,59
DNAJA4	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 4	NM_018602	-1,51			1,45
SPINK1	serine peptidase inhibitor, Kazal type 1	AA652500	-0,97			0,96
* MYL2	myosin, light polypeptide 2, regulatory, cardiac, slow	BF673973	-0,27			0,26
* CCL26	chemokine (C-C motif) ligand 26	AY358893	-0,62			0,74
* LST1	leukocyte specific transcript 1	NM_007161	-0,54			0,66
* ASCL1	Mammalian achaete-scute complex-like 1 (Drosophila) The protein activates transcription by binding to the E box (5'-CANNTG-3')	NM_004316	-0,40			0,21
* KPNA6	karyopherin alpha 6 (importin alpha 7)	NM_012316	-0,31			0,32
* SRPRB	signal recognition particle receptor, B subunit	BI918011	-0,62			0,41
* EDG8	endothelial differentiation, sphingolipid G-protein-coupled receptor, 8	AF331840	-0,99			0,59
* ERFFI1	ERBB receptor feedback inhibitor 1	AK096149	-0,78			0,61

Chapitre 4 : Etude de l'effet du cadmium et du zinc sur la réponse transcriptionnelle des cellules HZR

GENES PATHWAY 4: condition T0T24 vs Cd+						
* TEX10	testis expressed sequence 10	BC110864	0,24			-0,34
* SLC4A1	anion exchanger, chloride/bicarbonate exchanger at erythrocyte plasma membrane	NM_000342	1,73			-1,57
IER5	immediate early response 5	NM_016545	-1,44			1,26
LANCL1 ^{zn-}	LanC lantibiotic synthetase component C-like 1 (bacterial)	NM_006055	-0,57			0,38
* FAM50A	Family with sequence similarity 50, member A	CR612868	-0,59			0,63
* PSTPIP2	proline-serine-threonine phosphatase interacting protein 2	NM_024430	-0,36			0,51
* CYBRD1	cytochrome b reductase 1	AL136693	-0,30			0,31
* MUC6	mucin 6, oligomeric mucus/gel-forming	XM_290540	-0,18			0,25
* AKNA	AT-hook transcription factor	AK160382	-0,21			0,23
* GPR143	G protein-coupled receptor 143	NM_000273	-0,22			0,33
GENES NE RENTRANT PAS DANS LES PATHWAYS						
ZBTB43	zinc finger and BTB domain containing 43 unknown function	AF049907	-1,24			1,44
CTNBL1	catenin, beta like 1	AK091216	-1,23			1,43
	Homo sapiens Ku70-binding protein (KUB4) mRNA, partial cds	XM_099254	-1,04			1,54
GABBR1	gamma-aminobutyric acid (GABA) B receptor, 1	AJ225028	-0,98			1,17
Q9P0E8_HUMAN	Homo sapiens HSPC088 mRNA, partial cds	AF161351	-0,86			0,82
SPAG9	sperm associated antigen 9 The protein encoded by this gene is a scaffolding protein that brings together mitogen-activated protein kinases and their transcription factor targets.	AY850123	-0,75			0,70
HOMER1	homer homolog 1 (Drosophila) positive in HeLa cells Members of this family regulate group 1 metabotropic glutamate receptor function.	NM_004272	-0,71			0,67
SLC7A2	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, member 2)	NM_003046	-0,72			0,63
C8orf17	chromosome 8 open reading frame 17	NM_020237	-0,69			0,54
XM_089179	CUB and Sushi multiple domains 2	AB212622	-0,62			0,57
	Human DNA sequence from clone RP1-18C9 on chromosome 20	AL049709	-0,47			0,55
XM_096860	Hypothetical protein LOC145786	AK023283	-0,44			0,56
C7orf27	chromosome 7 open reading frame 27	AK131097	-0,54			0,43
C14orf56	chromosome 14 open reading frame 56	AK024445	-0,45			0,53
NMUR1	neuromedin U receptor 1 GROWTH HORMONE SECRETAGOGUE RECEPTOR FAMILY, MEMBER 3	NM_006056	-0,43			0,53
ZNF160	zinc finger protein 160	NM_198893	-0,44			0,51
MUC8	mucin 8	AY945262	-0,48			0,43
TIMP2	TIMP metalloproteinase inhibitor 2 apoptose in HeLa cells role in heavy metals	NM_003255	-0,47			0,44
ERGIC1	endoplasmic reticulum-golgi intermediate compartment (ERGIC) 1	BX647892	-0,42			0,46

Chapitre 4 : Etude de l'effet du cadmium et du zinc sur la réponse transcriptionnelle des cellules HZR

TNRC5	Trinucleotide repeat containing 5	AK124196	-0,46			0,40
MYCN ^{*Cd+Zn+}	v-myc myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived (avian)	AJ242956	-0,38			0,47
N4BP3	Nedd4 binding protein 3	NM_015111	-0,46			0,39
NM_022492	tetratricopeptide repeat domain 31	BC060805	-0,40			0,40
CEACAM6	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6 (non-specific cross reacting antigen)	M18728	-0,41			0,36
DLAT	dihydrolipoamide S-acetyltransferase (E2 component of pyruvate dehydrogenase complex)	NM_001931	-0,31			0,45
ARFRP1	ADP-ribosylation factor related protein 1	AL121845	-0,37			0,39
RABAC1	Rab acceptor 1 (prenylated)	BM474950	-0,36			0,38
SLC10A1	solute carrier family 10 (sodium/bile acid cotransporter family), member 1	L21893	-0,33			0,41
SIGLEC5	sialic acid binding Ig-like lectin 5	NM_003830	-0,33			0,40
SMPD4	sphingomyelin phosphodiesterase 4, neutral membrane (neutral sphingomyelinase-3)	AB037839	-0,32			0,37
NM_015887_1	Homo sapiens putative peroxisome microbody protein 175.1 mRNA, complete cds	AF050199	-0,30			0,35
AK023614	Hypothetical protein LOC149692	CR593014	-0,35			0,30
NM_138419_1	family with sequence similarity 54, member A	AK125758	-0,31			0,33
DNM3	dynamamin 3	AL136712	-0,24			0,41
PRB4	proline-rich protein BstNI subfamily 4 The protein encoded by this gene is a proline-rich salivary protein.	NM_002723	-0,33			0,29
KCNJ12	Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 12 This gene encodes an inwardly rectifying K ⁺ channel which may be blocked by divalent cations.	AK024229	-0,28			0,33
TBC1D13	TBC1 domain family, member 13	NM_018201	-0,27			0,34
TBX1	T-box 1 T-box genes encode transcription factors involved in the regulation of developmental processes.	AF373867	-0,25			0,25
THSD3	thrombospondin, type I, domain containing 3	AK056709	-0,24			0,26
YTHDF1	YTH domain family, member 1	BC050284	-0,23			0,26
ZNF236	zinc finger protein 236	AF085244	-0,24			0,23
C12orf25	chromosome 12 open reading frame 25	BC035621	-0,21			0,24
CHEK2	CHK2 checkpoint homolog (S. pombe) In response to DNA damage and replication blocks, cell cycle progression is halted through the control of critical cell cycle regulators.	AF217975	-0,16			0,24
NDUFB5	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 5, 16kDa The protein encoded by this gene is a subunit of the multisubunit NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I).	BX648034	0,74			-0,63

Table IV-1: Gènes différentiellement exprimés entre deux conditions.

IV-5.3 b Validation de quelques gènes différentiellement exprimés

L'utilisation des *microarrays* a permis de proposer des gènes différemment exprimés entre deux conditions. Certaines de ces propositions ont été testées par une méthode alternative.

Nous avons entrepris de valider quelques uns des gènes différemment exprimés pour deux conditions par PCR quantitative en temps réel.

IV-5.3 b1 Méthodologie

Nous avons utilisé les mêmes échantillons d'ARN totaux que ceux préparés pour l'étude transcriptomique afin de synthétiser l'ADN complémentaire. Pour cela nous avons utilisé le kit AffinityScript™ QPCR (Stratagene). Ce kit optimise la conversion de l'ARN en ADNc utilisé ultérieurement pour la RT-PCR quantitative et permet également d'obtenir un très bon rendement d'ADNc, pour les longs transcrits et pour de très faibles quantités d'ARN. L'étape d'amplification des transcrits en temps réel utilise le FullVelocity SYBR Green QPCR master mix qui inclut une ADN polymérase d'archaea spécifiquement destinée à réduire le temps de QPCR. Cette polymérase possède une importante thermostabilité et une absence d'activités exonucléase 3'-5' et 5'-3'.

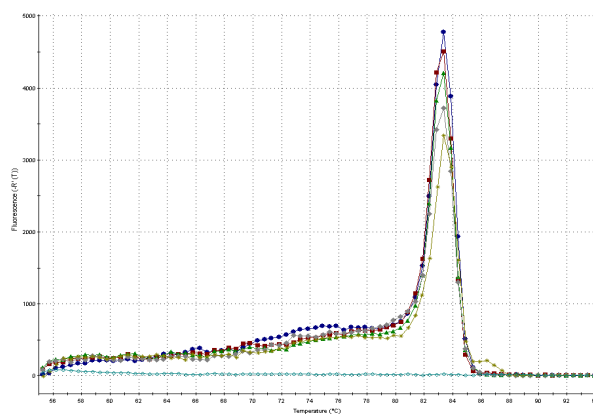
La RT PCR en temps réel permet de suivre l'amplification du transcrit en temps réel grâce à l'incorporation d'un fluorochrome, le Sybr Green dans l'ADN double brin. Le Sybr Green possède un maximum d'excitation à 497 nm et un maximum d'émission à 520 nm. Dans l'état non lié, le colorant n'a que peu de fluorescence alors que, lorsqu'il se lie à de l'ADN double brin produit à chaque cycle d'amplification, la fluorescence augmente. Ceci permet de suivre « en direct » l'accumulation du produit. Au moment de la dénaturation, tous les ADN sont simples brins et le Sybr Green est libre en solution, au cours de l'étape d'hybridation/élongation (réalisée simultanément avec l'enzyme utilisée), les amorces s'hybrident à la séquence cible et servent à former l'ADN double brin auquel se lie le Sybr Green. A partir d'un certain nombre de cycles que l'on appelle Ct (*cycle threshold*), la fluorescence commence à augmenter significativement au dessus du bruit de fond. Le Ct est inversement proportionnel au logarithme de la quantité initiale de transcrit dans l'échantillon ; plus la quantité de matrice initiale est importante et plus faible sera le nombre de cycles à partir duquel le signal de fluorescence est au dessus du bruit de fond. Cette méthode quantitative basée sur la détermination du cycle seuil Ct est précise car les mesures sont prises pendant la phase d'amplification exponentielle au moment où l'efficacité n'est pas influencée par la limitation en réactifs.

La synthèse du premier brin d'ADNc ainsi que les expériences de RT-PCR quantitative figurent dans la partie expérimentale à la fin de ce chapitre.

IV-5.3 b2 Validation des amorces

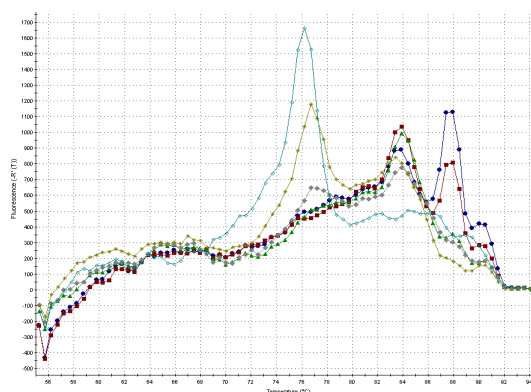
Avant de procéder à la comparaison de la quantité relative de transcrits présents dans chaque condition, il est nécessaire d'utiliser des amorces permettant une mesure fiable pour la RT-PCR quantitative. Pour cela les amorces sont choisies grâce à un logiciel en libre accès, Primer3 (Skaletsky, 2000), afin de satisfaire les conditions suivantes : température d'hybridation de 60°C et taille des amplicons comprise entre 90 et 150 bp.

Chaque couple d'amorces choisi doit être validé pour la RT-PCR quantitative. Pour cela, 2µg d'ARN total est rétrotranscrit en ADNc. Pour effectuer les courbes de calibration des amorces, le même échantillon d'ADNc est toujours utilisé, soit celui correspondant à la condition T0S1. Nous procédons ensuite par dilutions successives (4 à 5 au total) de quatre en quatre de matrice, le premier point étant l'échantillon d'ADNc T0S1 dilué au quarantième par rapport à l'ADNc initial. La courbe de dissociation est finalement déterminée pour chaque amorce visualisable après l'expérience grâce au logiciel MxPro™ QPCR (Stratagene). Au cours de ce programme de dissociation, tous les produits générés au cours de l'amplification sont chauffés à 95°C puis hybridés à 55°C et subissent une augmentation graduelle de température. Au cours de cette augmentation de température, les données sont collectées jusqu'à ce que la température atteigne 95°C. Comme contrôle de cette réaction il est indispensable d'ajouter le NTC (*Non Template control*), échantillon dans lequel tous les réactifs sont présents sauf l'ADNc.

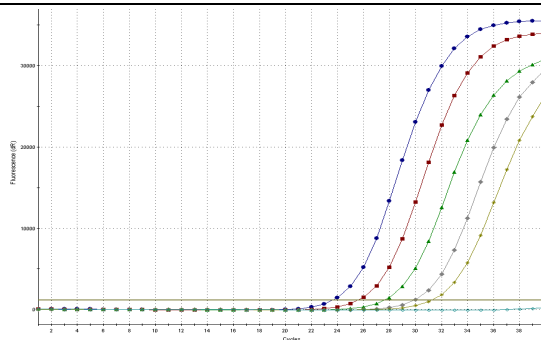


Exemple de courbe de dissociation obtenu avec les amorces déterminées pour le gène UPP1. L'opposée de la dérivée première de la fluorescence est rapportée en fonction de l'augmentation de température. Il n'y a qu'un produit principal obtenu ayant une température de fusion entre 82 et 84°C.

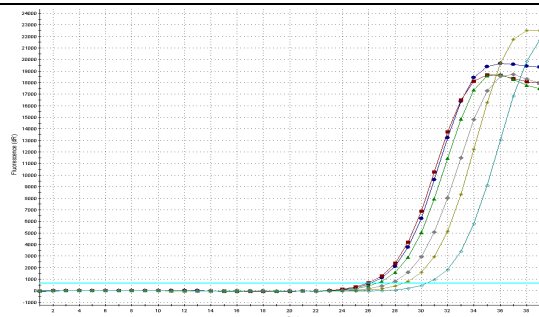
Le produit issu du NTC (trace à zéro) ne s'est pas formé : Il n'y a aucun dimère d'amorce.



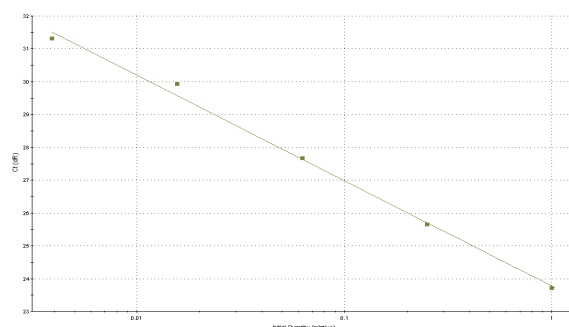
Exemple de courbe de dissociation obtenu avec les amorces déterminées pour le gène ELF5. Le produit toujours obtenu avec la matrice vers 84°C est loin d'être majoritaire. De plus on remarque la forte présence d'un dimère d'amorces dans le cas du NTC (courbe avec pic le plus intense à 76°C) ainsi que pour la plus faible dilution (courbe avec pic le second plus intense à 76°C). Finalement avec les amorces utilisées on remarque également un fort produit secondaire obtenu pour des températures de fusion autour de 88°C.



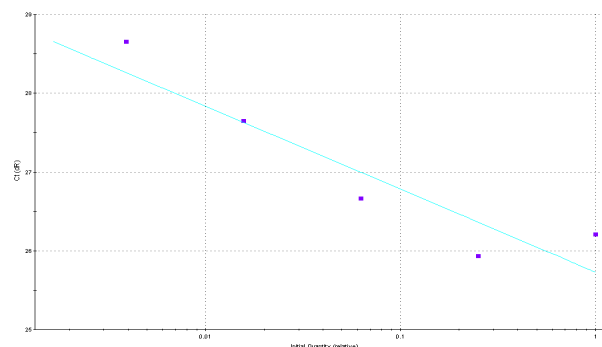
Courbe d'amplification. La fluorescence est rapportée en fonction du nombre de cycle. Chaque point pour une concentration donnée d'ADNc est fait en triplicat. On remarque très bien qu'il n'y a pas de NTC (courbe sous le seuil) et que chaque portion exponentielle de la courbe évolue régulièrement en fonction de la dilution de l'échantillon. La valeur de fluorescence seuil est représentée par la ligne horizontale.



Courbe d'amplification. La fluorescence est rapportée en fonction du nombre de cycle. Chaque point pour une concentration donnée d'ADNc est fait en triplicat. Les produits non spécifiques s'amplifient également (courbe la plus à droite). La valeur de fluorescence seuil est représentée par la droite horizontale.



Courbe de calibration correspondante. Les valeurs de fluorescence seuil sont rapportées en fonction de la quantité initiale relative d'ADNc. La première dilution est fixée arbitrairement à 1. La droite est parfaitement linéaire avec un coefficient de régression de 0,996.



Courbe de calibration correspondante. Les valeurs de fluorescence seuil sont rapportées en fonction de la quantité initiale relative d'ADNc. La première dilution est fixée arbitrairement à 1. La droite n'est pas linéaire ; le coefficient de régression est de 0,845.

La pente de la courbe standard est utilisée pour déterminer l'efficacité de la réaction calculée par l'équation : $\%Eff = 10^{[1/pente]-1}$. Comme la PCR est basée sur une amplification exponentielle, l'efficacité doit être de 100%, c'est-à-dire que la quantité de matériel doit doubler à chaque cycle. Une bonne efficacité est située entre 90 et 110% ; témoignant qu'il n'y a pas ou très peu de produit secondaire ou de dimère d'amorce.

Dans le cas de la courbe de gauche (amorce UPP1), l'efficacité est correcte tandis que dans le cas de celle de droite (ELF5), la valeur de l'efficacité est trop importante (790%). Ainsi les amorces pour ELF5 ne seront pas utilisées pour la PCR quantitative et devront être reconçues, au contraire des amorces pour UPP1 qui sont validées.

Nous avons testés 28 couples d'amorces, dont 13 ont été validés comme ci-dessus pour être utilisés en RT-PCR quantitative. Les résultats sont regroupés dans le tableau IV-2 :

Nom du gène	Efficacité (%)	R2 (pente)	VAL OU NON
OPCML	>1000	0,67	NON
WIBG	85,3	0,999	VAL
XM_041081_1	113,3	0,995	VAL
OCLN	115	1	VAL
FXVD2	>1000	0,878	NON
PDRG1	103,4	0,993	VAL
STK10	100,7	0,999	VAL
GET1_HUMAN	134,4	0,993	NON
UPP1	104,9	0,995	VAL
ESR2	253,9	0,988	NON
ELF5	790,6	0,846	NON
NUP50	106,7	0,996	VAL
KCNK7	>1000	0,663	NON
SERPINA6	621,7	0,794	NON
IL13RA1	107	0,995	VAL
MUC16	>1000	0,881	NON
KIF20A	111,1	0,991	VAL
LANCL1	86,4	0,99	VAL
MIA	167,1	0,99	NON
BCL2L12	196	0,955	NON
THBS3	86, 7	0,99	VAL
FCRLM1	-100	0,012	NON
NARG2	249,1	0,855	NON
CYP5R1	121, 8	0, 995	VAL
NFKBIZ	968,5	0,396	NON
SLC26A8	>1000	0,350	NON
MT1G	98,8	0,999	VAL
BCL7A	268,6	0,968	NON

IV-5.3 b3 RT-PCR Quantitative

Pour un gène donné, nous avons préféré utiliser une quantification absolue du niveau d'expression de ce gène pour chaque condition plutôt que de travailler en comparatif. Cela nous permet d'obtenir une gamme dynamique plus importante de la variation de ce gène en fonction des diverses conditions. Pour pouvoir analyser les données quantitatives, l'expérience doit comporter sur une même plaque :

- une courbe standard pour chaque couple d'amorces, préparée à partir de huit dilutions de deux en deux de l'échantillon T0S1 dont le premier point est une dilution par quarante de l'ADNc. Cela permet de vérifier la parfaite linéarité de la courbe obtenue.

- Les ADNc des diverses conditions (T0S1, T0S2, T0S3, T24S1, T24S2, T24S3, -ZnS1, -ZnS2, -ZnS3, Cd+ZnS1, Cd+ZnS2, Cd+ZnS3) dilués au 1:160 par rapport à l'ADNc initialement synthétisé et l'expérience est faite en duplicat (triangle sur la figure IV-9).

Suite à l'amplification du standard (T0S1) de dilutions successives, la courbe standard générée représente le Ct déterminé pour chaque dilution en fonction du logarithme de la quantité d'ADNc amplifié. Cette quantité est ici relative puisqu'elle est donnée en terme de dilutions par rapport à la quantité initiale. Cette courbe permet de vérifier pour chaque expérience que l'efficacité de l'amplification ainsi que la linéarité de la gamme sont respectées (Figure IV-9).

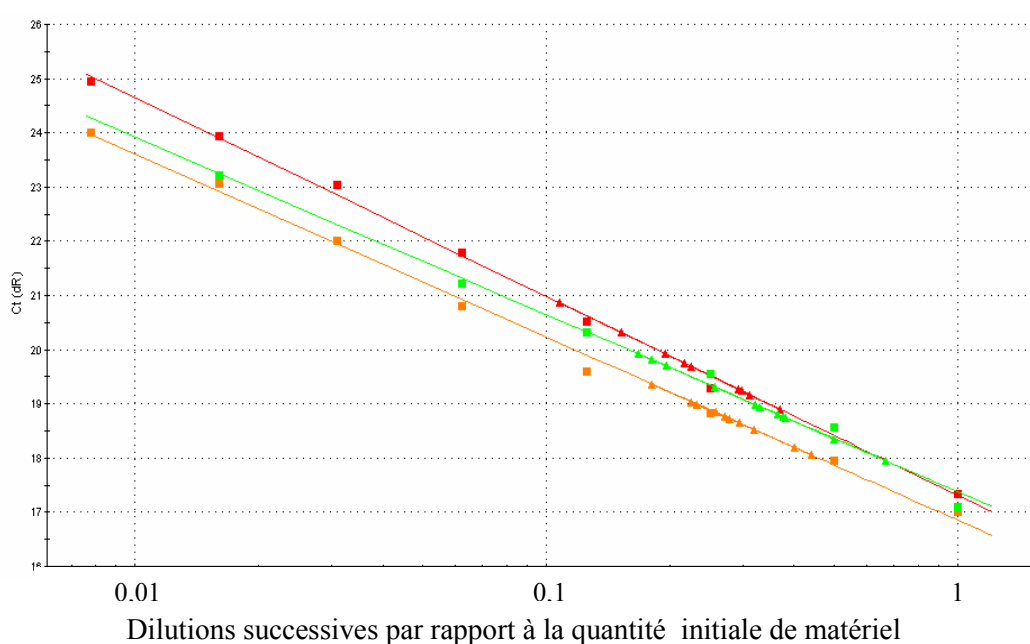


Figure IV-9: Courbes standard effectuées pour les gènes qui permettront la normalisation par rapport aux gènes d'intérêt. La β -actine est en rouge, la GAPDH en orange et la ribosomal phosphoprotein PO

Chapitre 4 : Etude de l'effet du cadmium et du zinc sur la réponse transcriptionnelle des cellules HZR

(RPLPo2) en vert. Les courbes standard ont été générées par amplification de l'ADNc de T0S1 (carré) à des dilutions successives. Les ADNc correspondant à diverses conditions (triangle) dont il faut déterminer la quantité sont déposés sur la même plaque que la gamme de standards. Les valeurs de fluorescence seuil sont rapportées en fonction de la quantité initiale relative d'ADNc.

La première dilution est fixée arbitrairement à 1. Cette courbe permet de vérifier pour chaque expérience que l'efficacité de l'amplification ainsi que la linéarité. Les paramètres obtenus sont répertoriés dans le tableau IV-3 :

Gènes	Rs _q	Equation droite	Eff (%)
Actine	0,997	$Y = -3,672 \cdot \text{LOG}(X) + 17,31$	87,2
GAPDH	0,996	$Y = -3,376 \cdot \text{LOG}(X) + 16,85$	97,8
RPLPo2	0,992	$Y = -3,272 \cdot \text{LOG}(X) + 17,38$	102,1

Cette procédure est effectuée pour chaque gène testé et les échantillons sont toujours utilisés à la même dilution. La courbe standard avec les gènes normalisateurs est refaite à chaque fois que de l'ADNc est re-synthétisé. Deux expériences ont été réalisées pour chaque gène testé afin d'établir la reproductibilité des expériences réalisées par Q-PCR et de pouvoir les comparer à l'expérience réalisée avec les puces.

Les valeurs « brutes » obtenues à partir de la courbe standard pour un gène d'intérêt sont rapportées aux valeurs correspondantes obtenues pour chacun des 3 gènes normalisateurs. Parmi les 13 gènes dont les amorces étaient correctes pour effectuer de la Q-PCR, 7 ont pu être testés jusqu'à présent. Les valeurs moyennes sont présentées dans le tableau IV-4 ci-dessous :

	KIF/Actine	KIF/RPLP	KIF/GAPDH	WIGB/Actine	WIGB/RPLP	WIGB/GAPDH
ToS1	1,986	1,848	2,364	1,122	1,044	1,336
ToS2	3,303	2,022	1,978	3,394	2,079	2,033
ToS3	2,568	2,835	3,498	1,677	1,852	2,285
T24S1	1,961	3,025	2,034	0,921	1,421	0,956
T24S2	2,772	3,590	2,121	2,386	3,090	1,826
T24S3	3,324	2,911	3,324	1,800	1,576	1,800
-ZnS1	2,931	1,666	2,717	2,347	1,334	2,176
-ZnS2	5,120	1,475	3,056	5,073	1,462	3,028
-ZnS3	4,675	2,112	3,027	5,917	2,674	3,831
	UPP1/Actine	UPP1/RPLP	UPP1/GAPDH	XM_041081/ Actine	XM_041081/ RPLP	XM_041081/ GAPDH
ToS1	1,014	0,943	1,206	1,245	1,158	1,482
ToS2	0,468	0,287	0,280	5,000	1,302	0,269
ToS3	0,898	0,991	1,223	3,767	4,159	5,132
T24S1	1,020	1,574	1,058	8,069	12,452	8,372
T24S2	2,516	3,259	1,925	8,140	10,542	6,228
T24S3	0,880	0,770	0,880	5,120	4,482	5,120
-ZnS1	0,542	0,308	0,502	0,981	0,558	0,910
-ZnS2	0,639	0,184	0,38	1,890	0,544	1,128
-ZnS3	0,402	0,182	0,261	1,515	0,684	0,981

Chapitre 4 : Etude de l'effet du cadmium et du zinc sur la réponse transcriptionnelle des cellules HZR

	UPP1/Actine	UPP1/RPLP	UPP1/GAPDH	CYP5R1/ Actine	CYP5R1/ RPLP	CYP5R1/ GAPDH
ToS1	1,014	0,943	1,206	1,531	1,424	1,822
ToS2	0,468	0,287	0,280	3,096	1,896	1,854
ToS3	0,898	0,991	1,223	18,532	20,459	25,245
T24S1	1,020	1,574	1,058	12,270	18,934	12,730
T24S2	2,516	3,259	1,925	19,209	24,880	14,698
T24S3	0,880	0,770	0,880	2,627	2,300	2,627
Cd+ZnS1	0,444	0,351	0,317	0,630	0,498	0,449
Cd+ZnS2	1,040	1,188	0,474	1,617	1,847	0,737
Cd+ZnS3	0,152	NA	0,285	0,607	0,702	1,140
	THBS/Actine	THBS/RPLP	THBS/ GAPDH	MT1G/ Actine	MT1G/ RPLP	MT1G/ GAPDH
ToS1	0,638	0,594	0,760	0,810	0,753	0,964
ToS2	0,181	0,111	0,108	0,862	0,528	0,516
ToS3	0,614	0,678	0,837	0,058	0,064	0,079
T24S1	0,269	0,416	0,280	0,086	0,132	0,089
T24S2	1,651	2,139	1,263	0,112	0,145	0,085
T24S3	2,627	2,300	2,627	0,058	0,051	0,058
Cd+ZnS1	0,208	0,165	0,149	12,622	9,972	9,002
Cd+ZnS2	0,729	0,833	0,332	9,925	11,335	4,524
Cd+ZnS3	0,607	0,702	NA	2,717	3,143	5,104

La principale difficulté qui a été rencontrée est que la variation du niveau d'expression d'un gène donné pour une même condition est relativement importante, par exemple pour la condition +Zinc qui regroupe en fait T0S1, T0S2, T0S3, T24S1, T24S2 et T24S3. Donc seuls les niveaux d'expression bien distincts peuvent être mis en évidence entre deux conditions.

Nous avons donc entrepris de vérifier si les résultats obtenus à l'aide des « puces » étaient corrélés aux résultats de PCR quantitative. Le principe est de voir dans un premier temps si les résultats de Q-PCR corrélaient entre eux puisque deux expériences indépendantes sont réalisées pour chaque gène testé. Il est ainsi déterminé une erreur sur les expériences de Q-PCR réalisées. Les valeurs des résultats obtenus lors de la Q-PCR sont confrontées à celles obtenues pour les résultats de « puce » et la différence existant entre les deux permet le calcul d'un RMS (*root mean square*) dont la valeur doit être inférieure ou égale à l'erreur acceptée entre deux expériences de Q-PCR. On ne retient donc que les gènes qui corrélaient entre les deux méthodes autant qu'ils corrélaient entre deux Q-PCR indépendantes.

Tous les gènes testés et qui sont différentiellement exprimés entre la condition T0T24 (c'est-à-dire les cellules HZR en présence de 100 µM de zinc) et la condition -Zn (cellules HZR sans zinc dans le milieu d'entretien pendant une semaine) corrélaient entre la Q-PCR et les puces. Ces gènes sont WIGB (Within bgcn homolog (*Drosophila*)), KIF20A (kinesin family member 20A), UPP1 (uridine phosphorylase 1) et XM_041081 (similar to *iscu2*, NifU-like N-terminal domain). WIGB, UPP1 et XM_041081 sont réprimés dans la condition -Zn et KIF est sur-exprimé dans la condition -Zn. Parmi ces quatre gènes, WIGB et XM_041081 sont de fonctions inconnues.

Les gènes qui corrélaient entre la Q-PCR et les puces et qui sont différentiellement exprimés entre la condition T0T24 (c'est-à-dire les cellules HZR en présence de 100µM de zinc) et la condition Cd+Zn+ (cellules HZR exposées pendant 24 heures à 100 µM de zinc et 100 µM de cadmium) sont UPP1 et CYB5R1 (cytochrome b5 reductase 1). Ces deux gènes sont réprimés dans la condition Cd+Zn+. Pour mémoire, UPP1 est aussi réprimé par retrait du zinc du milieu de culture des cellules HZR. Donc, pour ce gène, le retrait de zinc et l'ajout de cadmium ont le même effet qualitatif sur son expression. Le gène THBS3 (thrombospondin 3) est à la limite de l'acceptabilité de la corrélation et il est sur-exprimé dans la condition Cd+Zn. Enfin MT1G (métallothionéine-1G) ne corrèle absolument pas. Ce gène varie en sens inverse de façon très claire par rapport à ce qui est attendu.

En effet, plusieurs études montrent que les métallothionéines sont sur-exprimées lorsque les cellules sont soumises à un stress cadmium (Beattie et al., 2005; Beyersmann and Hechtenberg, 1997; Yamada and Koizumi, 2002). Cependant les cellules HZR sur-expriment déjà les métallothionéines par rapport aux cellules HeLa (Chimienti et al., 2001) et leur niveau d'induction en présence de cadmium en plus du zinc n'a jamais été décrit. La non-corrélation entre l'étude puce et la Q-PCR sur ce sujet nous amène à rester vigilants quand à la pertinence des résultats bruts issus des expériences « puces ». En particulier les similitudes de séquences entre les différents isozymes des petites métallothionéines humaines sont telles qu'il semble difficile de générer des sondes 50-mers sélectives pour les mRNA des métallothionéines de classe 1 (Figure IV-10). Pourtant, les puces possèdent trois spots distincts pour cette famille de gènes dont les séquences ne sont pas communiquées par le fournisseur.

```

MT-1G_  ATGGACCCCAACTGCTCCTGTGCGCGCTGGTGTCTCCTGCACCTGCGCCAGCTCCTGCAAG  60
MT-1F_  ATGGACCCCAACTGCTCCTGCGCGCGCTGGTGTCTCCTGCACCTGCGCTGGTTCTGCAAG  60
MT-1A_  ATGGACCCCAACTGCTCCTGCGCCACTGGTGGCTCCTGCACCTGCACTGGCTCCTGCAAA  60
MT-1E_  ATGGACCCCAACTGCTCTTGCGCCACTGGTGGCTCCTGCACGTGCGCCGGCTCCTGCAAG  60
MT-1H_  ATGGACCCCAACTGCTCCTGCGAGGCTGGTGGCTCCTGCGCCTGCGCCGGCTCCTGCAAG  60
MT-1X_  ATGGACCCCAACTGCTCCTGCTCGCCTGTTGGCTCCTGTGCCTGTGCCGGCTCCTGCAAA  60
MT-1M_  ATGGACCCCAACTGCTCCTGCACCACTGGTGTCTCCTGCGCCTGCACCGGCTCCTGCACG  60
MT-1B_  ATGGATCCCAACTGCTCCTGCACCACAGGTGGCTCCTGTGCCTGCGCCGGCTCCTGCAAG  60
*****

MT-1G_  TGCAAAGAGTGCAAATGCACCTCCTGCAAGAAGAGCTGCTGCTCCTGCTGCCCTGTGGGC  120
MT-1F_  TGCAAAGAGTGCAAATGCACCTCCTGCAAGAAGAGCTGCTGCTCCTGCTGCCCCGTGGGC  120
MT-1A_  TGCAAAGAGTGCAAATGCACCTCCTGCAAGAAGAGCTGCTGCTCCTGCTGCCCCATGAGC  120
MT-1E_  TGCAAAGAGTGCAAATGCACCTCCTGCAAGAAGAGCTGCTGTTTCTGCTGCCCCGTGGGC  120
MT-1H_  TGCAAAAAGTGCAAATGCACCTCCTGCAAGAAGAGCTGCTGCTCCTGTTGCCCCCTGGGC  120
MT-1X_  TGCAAAGAGTGCAAATGCACCTCCTGCAAGAAGAGCTGCTGCTCCTGCTGCCCTGTGGGC  120
MT-1M_  TGCAAAGAGTGCAAATGCACCTCCTGCAAGAAGAGCTGCTGCTCCTGCTGCCCCGTGGGC  120
MT-1B_  TGCAAAGAGTGCAAATGTACCTCCTGCAAGAAGTGTGCTGCTCCTGCTGCCCCGTGGGC  120
*****

```

Chapitre 4 : Etude de l'effet du cadmium et du zinc sur la réponse transcriptionnelle des cellules HZR

MT-1G_	TGTGCCAAGTGTGCCCAGGGCTGCATCTGCAAAGGGGCATCGGAGAAGTGCAGCTGCTGC	180
MT-1F_	TGTAGCAAGTGTGCCCAGGGCTGTGTTTGCAAAGGGGCGTCAGAGAAGTGCAGCTGCTGC	180
MT-1A_	TGTGCCAAGTGTGCCCAGGGCTGCATCTGCAAAGGGGCATCAGAGAAGTGCAGCTGCTGT	180
MT-1E_	TGTGCCAAGTGTGCCCAGGGCTGCGTCTGCAAAGGGGCATCGGAGAAGTGCAGCTGCTGT	180
MT-1H_	TGTGCCAAGTGTGCCCAGGGCTGCATCTGCAAAGGGGCGTCAGAGAAGTGCAGCTGCTGT	180
MT-1X_	TGTGCCAAGTGTGCCCAGGGCTGCATCTGCAAAGGGACGTCAGACAAGTGCAGCTGCTGT	180
MT-1M_	TGTGCCAAGTGTGCCCACGGCTGTGTCTGCAAAGGGACGTTGGAGAACTGCAGCTGCTGT	180
MT-1B_	TGTGCCAAGTGTGCCCAGGGCTGTGTCTGCAAAGGCTCATCAGAGAAGTGCCGCTGCTGT	180
	*** ***** * ***** * * ** ** ** *	
MT-1G_	GCCTGA	186
MT-1F_	GACTGA	186
MT-1A_	GCCTGA	186
MT-1E_	GCCTGA	186
MT-1H_	GCCTGA	186
MT-1X_	GCCTGA	186
MT-1M_	GCCTGA	186
MT-1B_	GCCTGA	186
	* ****	

Figure IV-10 : Alignement à l'aide du logiciel CLUSTAL-W des séquences codantes des gènes des différents isoformes humaines de la MT-1. Les bases totalement conservées dans toutes les séquences sont marquées par une étoile sur la dernière ligne. La plupart des autres positions ne changent que pour une ou deux séquences.

IV-5.4 Examen des gènes régulés par MTF-1.

Au vu des résultats des analyses de transcriptome figurant dans le tableau IV-1 déterminés pour les conditions T0T24 et -Zn, il semble légitime de porter attention aux gènes communément régulés par le zinc. De ce point de vue, les cellules HZR possèdent un niveau d'expression de métallothionéines plus important que celui des cellules HZR dont le zinc a été enlevé pendant sept jours (Chimienti et al., 2001), ce qui correspond au traitement effectué. Ainsi nous avons souhaité savoir ce qu'il advenait des gènes qui sont sous la dépendance du facteur de transcription MTF-1. Ce facteur de transcription est activé par le zinc (Andrews, 2001), mais il n'est pas régulé par le zinc au niveau transcriptionnel (Auf der Maur et al., 2000). Les promoteurs des gènes MT-1 (métallothionéine), ZnT-1, γ GCS (*gamma glutamyl-cysteine synthetase heavy chain*), CEBPA ou C/EBP α (CCAAT/ enhancer binding protein), α -fetoprotéine et PGF (*Placenta Growth Factor*) possèdent un ou plusieurs éléments de réponse aux métaux ou MRE (*Metal Responsive Element*) sur lesquels se fixe MTF-1 (Lichtlen and Schaffner, 2001; Lichtlen et al., 2001). Outre MT-1 et ZnT-1 qui ont été présentés dans l'introduction, C/EBP α est un facteur de transcription dépendant du cAMP et impliqué dans le maintien de l'état différencié et non-prolifératif de certaines cellules. L' α -fetoprotéine est une protéine sérique semblable à l'albumine, qui peut donc lier des métaux, et possède généralement une action anti-apoptotique. L'expression, en échelle logarithmique par

rapport à la référence, des différents gènes présentant des sites MRE est reportée dans le tableau IV-5.

	T0S1	T0S2	T0S3	T24S1	T24S2	T24S3	-ZnS1	-ZnS2	-ZnS3
MTF-1	0,4413	-0,0596	0,3648	-0,7578	-0,7661	0,1400	1,3428	-0,0118	0,6904
ZnT-1	-0,7031	0,4726	1,3162	0,3221	2,0602	1,9959	0,6836	0,4218	0,9985
MT-1G	0,0513	0,6724	0,8370	0,6944	1,2578	0,5926	0,7140	-0,2584	0,8576
γ -GCS	0,6520	-5,4398	1,4310	0,5565	0,3165	2,3802	-5,5057	-0,2713	0,8701
cebp α	-0,0638	-0,1286	0,9789	0,0348	-0,1395	-5,2586	0,0158	0,2212	-0,6073
PGF	0,4524	0,4977	-5,4398	0,2231	0,6182	-0,5338	-0,2853	-0,1492	-0,1720

De ces données il n'apparaît pas de variations homogènes en fonction du retrait de zinc du milieu. De plus l' α fetoprotéine ne figure pas, car le gène correspondant n'a pas franchi les premiers filtres de reproductibilité de l'analyse des données d'hybridation. Ainsi, de ces valeurs, il semble que les cellules HZR ne répondent pas aux variations des concentrations en zinc par l'intermédiaire de MTF-1. La question de savoir si l'adaptation des cellules HZR au zinc inclut l'inactivation de la régulation par MTF-1 n'a pas pu être abordée dans ce travail, mais elle est une voie d'investigation à développer.

IV-5.5 Examen d'un candidat prometteur pour expliquer l'adaptation des cellules HZR vis-à-vis du zinc et l'inhibition de l'entrée de cadmium.

Parmi les candidats pouvant être impliqués dans la limitation de l'entrée du cadmium chez les cellules HZR, nous avons retenu FXYD2 qui semble être sur-exprimé dans les cellules HZR maintenues en présence de 100 μ M de zinc par rapport aux cellules dont le zinc a été enlevé pendant une semaine (Tableau IV-1). La protéine FXYD2 est une petite protéine membranaire constituant une sous-unité régulatrice γ de l'ATPase sodium potassium. Il était donc envisageable que sa surexpression puisse inhiber ce transporteur et l'import de cadmium si ce dernier est pris en charge par ce complexe, une notion jamais mise en évidence jusqu'à présent.

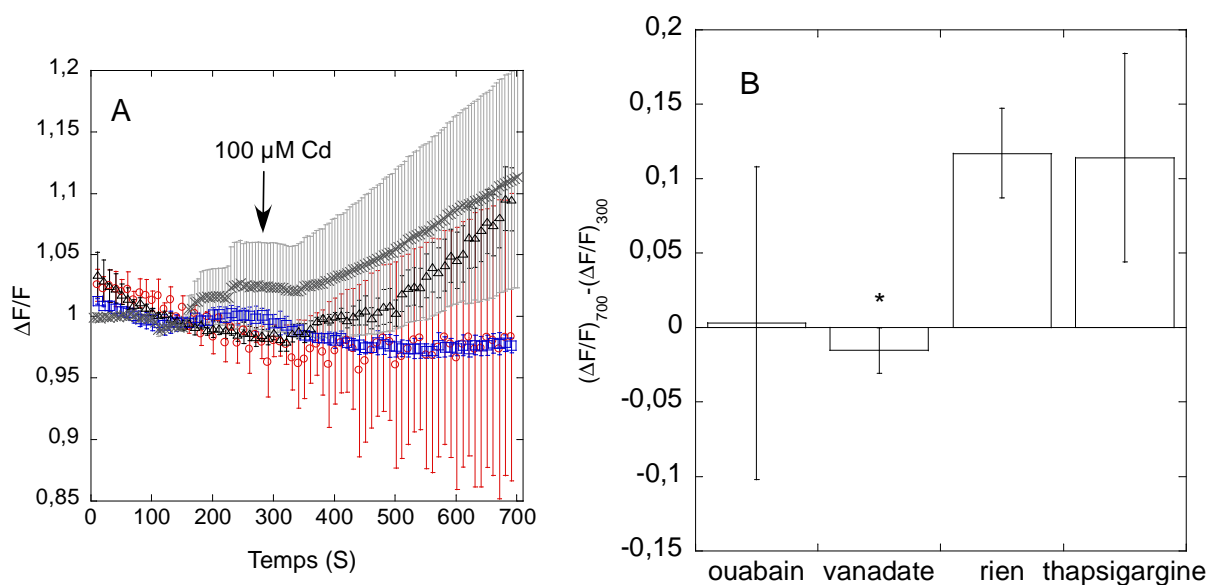
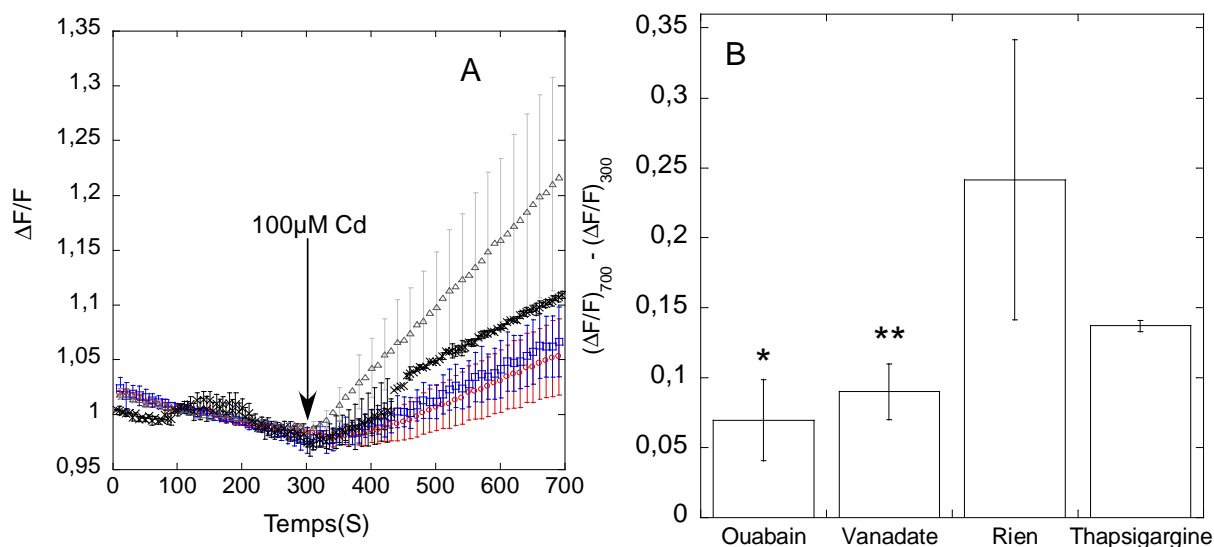
FXYD2 a principalement été identifiée dans les cellules rénales (Arystarkhova et al., 2002). Cette protéine possède un rôle modulateur important. En effet, il a été montré par électrophysiologie sur des oocytes de xénope que FXYD2 augmentait l'affinité apparente de l'ATPase Na,K vis-à-vis du K^+ , seulement pour de forts potentiels de membrane négatifs, que ce soit en absence ou en présence de Na^+ . D'autre part, FXYD2 est capable de diminuer cette affinité apparente pour des potentiels de membrane moins négatifs, et cela seulement en présence de sodium extracellulaire. Enfin, FXYD2 permet également d'augmenter l'affinité

de la pompe pour l'ATP. Un des effets majeurs de FXYP2 est également de diminuer l'affinité de l'ATPase Na,K pour le sodium (Geering, 2006). Les FXYP2 humaine et de rat possèdent deux variants γ a et γ b qui ont une séquence N terminale différente. FXYP2a et FXYP2b, produisent des effets identiques sur les propriétés catalytiques et de transport de l'ATPase Na,K. Toutefois les effets fonctionnels diffèrent selon les modifications post-traductionnelles de ces deux variants qui varient suivant le type cellulaire (Arystarkhova et al., 2002). Dans les cellules murines du tube collecteur rénal (IMCD3), il a été montré que l'activation de *c-jun* régulaie FXYP2 au niveau transcriptionnel tandis que l'activation de l'inositol 3-phosphate kinase influait sur la traduction de FXYP2. L'induction du variant FXYP2a dans les cellules rénales s'accompagne d'une réduction de l'activité de l'ATPase Na-K, ainsi que de la division cellulaire (Geering, 2005). Cependant, aussi bien au niveau transcriptionnel que protéique, FXYP2 n'est pas détectable dans les lignées cellulaires HeLa au contraire de FXYP3 et FXYP5 (Arystarkhova et al., 2007). Son expression dans les cellules HZR n'a pas été décrite.

Si FXYP2, ou plutôt son absence, est impliquée, par un quelconque mécanisme, dans l'entrée du cadmium chez les cellules HeLa, il devrait y avoir une répercussion sur la modulation de la pompe à sodium/ potassium. Ainsi l'inhibition de l'ATPase Na, K pourrait entraîner une diminution de l'entrée de cadmium. L'ATPase Na,K est une protéine membranaire, de la famille des ATPase de type P. Elle permet le maintien du gradient de concentration du sodium et du potassium à travers la membrane en exportant 3 atomes de sodium et en important 2 atomes de potassium. L'énergie nécessaire à ce processus est fournie par l'hydrolyse de l'ATP.

Pour évaluer le rôle éventuel de l'ATPase Na⁺,K⁺ et de FXYP2 dans l'import de cadmium dans les cellules HeLa et HZR dépourvues de zinc, notre étude a consisté à incuber les cellules HeLa ainsi que HZR dont le zinc a été enlevé pendant une semaine (HZR-Zn) en présence de ouabaïne (100 μ M) ou de vanadate (200 μ M) pendant 7 min, puis de visualiser les flux cationiques par imagerie, comme effectué au Chapitre I.

L'ouabaïne est un stéroïde cardiotonique qui possède une très forte affinité pour la pompe Na,K (Artigas and Gadsby, 2006). L'interaction entre l'ouabaïne et l'ATPase induit une perturbation de la configuration de l'ATPase qui est transmise aux phospholipides adjacents altérant leur affinité pour le calcium. En effet, il a été montré que ces interactions peuvent conduire à une augmentation de calcium lié aux phospholipides membranaires en présence de



concentrations physiologiques de Na^+ , K^+ ou les deux (Gervais et al., 1977). De son côté, le vanadate est un analogue du phosphate qui bloque nombre d'ATPase dans une conformation incapable d'accomplir son cycle catalytique (Segall et al., 2005).

Pour les cellules HeLa, l'incubation en présence de ouabaïne (Figure IV-11 A rond rouge) ou de vanadate (Figure IV-11 A carré bleu) semble induire une diminution de la vitesse d'augmentation de la fluorescence ($d(\Delta F/F)/dt = 0.0138 \text{ min}^{-1}$ pour la ouabaïne et $d(\Delta F/F)/dt = 0.018 \text{ min}^{-1}$ pour le vanadate) après l'application de cadmium (300 s) par rapport aux cellules non prétraitées par ces deux inhibiteurs (Figure IV-11 A triangle et croix) pour laquelle la pente est de $d(\Delta F/F)/dt = 0.048 \text{ min}^{-1}$. Cependant même si la diminution de $d(\Delta F/F)/dt$ semble être importante (Figure IV-11 B), les écart-types des variations de fluorescence pour toutes les cellules observées sont également très larges (Figure IV-11 B). Un test t de Student nous indique que ces différences sont significatives, en effet, $p=0.0053$ pour la condition ouabaïne comparée la condition « contrôle » et $p=0.019$ pour la condition vanadate comparé à la condition « contrôle ». Ainsi, le vanadate comme l'ouabaïne semblent induire une réduction significative de l'entrée de cadmium dans les cellules HeLa. Dans les expériences où la thapsigargine est utilisée afin de vider les stocks calciques intracellulaires, l'application du cadmium entraîne une augmentation de fluorescence plus faible (entre 300 et 700s, la pente est de $d(\Delta F/F)/dt = 0.0276 \text{ min}^{-1}$) mais pas significativement différente de celle obtenue sur des cellules où la thapsigargine n'a pas été utilisée. Ce résultat pourrait sembler en contradiction avec celui du Chapitre 1, paragraphe I-5.2 b dans lequel il était mentionné que l'augmentation de fluorescence était significativement différente entre le cas où la thapsigargine est appliquée et le cas où elle ne l'est pas. Cependant il n'y a pas de contradiction car, entre 800 et 1820 s (non montré sur la Figure IV-11), l'augmentation de fluorescence est bien plus importante pour les cellules non pré-traitées ; la pente obtenue est en effet de $d(\Delta F/F)/dt = 0.204 \text{ min}^{-1}$.

Pour les cellules HZR dont le zinc a été enlevé pendant une semaine, l'incubation préalable dans l'ouabaïne (Figure IV-12 A rond rouge) entraîne des variations de fluorescence lors de l'application du cadmium très bruitées qui ne peuvent pas être considérées, pour cette raison, comme significatives par rapport aux cellules non pré-incubées avec l'ouabaïne ($p=0,39$). Au contraire, le vanadate (Figure IV-12 A carré bleu) empêche clairement l'augmentation de fluorescence ($p=0,017$). Donc le vanadate, au moins, permet une réduction significative de l'entrée de cadmium dans ces cellules. L'application de thapsigargine sur ces

cellules privées d'excès de zinc entraîne, suite à l'application du cadmium, une augmentation de fluorescence similaire à celle des mêmes cellules dont les stocks calciques intracellulaires n'ont pas été vidés.

Ces expériences nous indiquent que l'application d'ouabaine induit une diminution, qui semble être significative, de l'entrée de cadmium dans les cellules HeLa, alors que les expériences réalisées sur les boîtes de cellules HZR-Zn ne nous permettent pas de conclure. Ainsi, l'inhibition de la pompe sodium, potassium par l'ouabaine ne semble pas suffisante pour expliquer la diminution totale de l'augmentation de fluorescence dans les cellules HZR par ajout de cadmium, mais elle peut sans doute expliquer, en partie, la réduction de l'entrée de ce métal dans ces cellules. Le vanadate permet chez les cellules HZR-Zn et HeLa une diminution quasi complète de l'entrée de cadmium, or ce composé possède une action moins ciblée que l'ouabaine et agit sur d'autres ATPase que l'ATPase Na^+, K^+ . Ainsi, les résultats obtenus ne nous permettent pas de conclure définitivement que l'ATPase Na^+, K^+ est responsable en totalité de la limitation de l'entrée de cadmium dans les cellules HZR. Il a même été décrit au contraire que le cadmium inhibait l'ATPase Na^+, K^+ , sans doute une fois qu'il franchit la membrane plasmique (Kinne-Saffran et al., 1993). Ainsi il semble que la sous-unité régulatrice FXYD2 ne soit pas un acteur directement impliqué dans la résistance des cellules HZR vis-à-vis du cadmium.

IV-5.6 Examen des autres candidats différentiellement exprimés entre les conditions T0T24 vs -Zn

Parmi les autres gènes d'expression différente entre les conditions T0T24 et -Zn (cellules HZR sans excès de zinc pendant une semaine), il y en a très peu dont le produit est clairement un transporteur ou un canal pouvant permettre le passage de cations divalents à travers la membrane plasmique. Une exception est KCNK7, un représentant des canaux potassiques. Mais ce gène est plus exprimé dans les cellules HZR entretenues avec du zinc que dans celles privées de ce métal : il est donc peu probable que l'activité de la protéine correspondante soit responsable du phénotype de ces cellules, en particulier de la faible entrée du cadmium remplaçant le zinc dans le milieu. D'autre part, IFT81 varie en sens inverse mais il est annoté seulement par homologie avec un transporteur de *Chlamydomonas* dont il y a très peu d'informations sur ce gène et son produit. Enfin, un certain nombre de gènes pouvant coder pour des protéines exprimées au niveau de la membrane plasmique sont présents : il s'agit de récepteurs couplés aux protéines G (GPR143, GPR124...), d'autres récepteurs

(IL13RA1, ESR2...) ou de divers régulateurs potentiels (ITGA par exemple). Mais le mode d'action de ces protéines peut être tellement subtil qu'il semble plus raisonnable de les considérer dans leur globalité (voir plus loin) que de faire un pari sur leur participation directe au phénotype des cellules HZR.

IV-5.7 Aperçu succinct des analyses conduites sur les résultats des données d'expression.

Ces analyses ont été réalisées avec la suite logicielle *Ingenuity Pathways Analysis* (Ingenuity® Systems, www.ingenuity.com). Les données d'expression pour deux conditions, telles que présentées dans le Tableau IV-1, ont été utilisées successivement. Cette suite logicielle introduit dans l'analyse une base de données de connaissances permettant d'associer les gènes filtrés par l'expérience dans des relations biologiques issues de la littérature. Les résultats de ces calculs se présentent ici comme des réseaux reliant certains des gènes sélectionnés par les expériences faites sur « puces » et validées, pour certaines, par Q-PCR.

Les gènes soumis pour analyse par cette méthode ont été organisés par le logiciel comme résumé dans le Tableau IV-6 ci-dessous.

	Nombre de gènes soumis	<i>Mapped</i> ^a	<i>unmapped</i> ^a	Reconnus dans des <i>Pathways</i> ^b de plus de 5 gènes ^c
Zn- vs Zn+	67	51	16	38
Cd vs Zn	191	100	91	62
Cd+Zn/Zn	160	105	55	55
Cd+Zn/Cd	98	64	33	36

^a *mapped* désigne les gènes reconnus dans la base de données du logiciel, *unmapped* ceux qui ne le sont pas. Cette dernière attribution est principalement due aux gènes non annotés ou pour lesquels les informations bibliographiques sont très pauvres.

^b cette colonne dénombre les gènes pour lesquels une association avec au moins un autre gène existe dans la base de données du logiciel.

^c seuls les gènes figurant dans le fichier soumis sont pris en compte pour sélectionner les réseaux : par exemple les réseaux dans lesquels ne figurent, le plus souvent, qu'un seul gène parmi ceux que nos expériences ont sélectionné ne sont pas retenus. Le nombre rapporté est la somme des gènes, sans redondance, pouvant être associés dans des réseaux comportant plus de 5 des gènes soumis.

Ce Tableau montre que la proportion de gènes pris en compte pour l'analyse varie beaucoup entre couples de conditions. Ceci est aussi en rapport avec le peu de recouvrements observés entre les différentes parties du Tableau IV-1. Les résultats correspondant aux lignes du Tableau IV-6 seront d'abord discutés individuellement, puis quelques remarques générales seront rassemblées.

IV-5.8 Analyse globale des gènes régulés par la concentration de zinc dans les cellules HZR. Recherche de candidats pouvant expliquer le phénotype de ce clone.

Pour aborder cette question, les conditions considérées sont celles dans lesquelles les cellules sont maintenues dans leur milieu habituel contenant 100 μ M de zinc (boîtes 1 et 2 du paragraphe IV-3.1) et celle pour laquelle cette concentration de zinc a été enlevée pendant une semaine (boîtes 5). La justification de cette comparaison est que les cellules HZR réversent vers le phénotype des cellules HeLa quand l'excès de zinc est enlevé du milieu de culture. Si les composants cellulaires responsables du phénotype 'HZR' décrit au Chapitre 1 (résistance à de fortes concentrations de zinc intracellulaire, inhibition de l'import de cadmium) sont régulés au niveau de l'expression de leurs gènes, ils devraient apparaître dans cette comparaison.

Comme déjà mentionné précédemment (IV-5.6), l'ensemble des gènes obtenu est très pauvre en gènes codant pour des protéines connues pour être impliquées dans l'homéostasie du zinc ou en protéines capables de faire passer la membrane plasmique à des ions divalents. Par contre, une majorité de ces gènes peut s'organiser en trois réseaux de signalisation locaux rassemblant environ (suivant les expériences, c'est-à-dire suivant la lame considérée) 14, 13 et 11 gènes. De plus ces réseaux partagent quelques gènes et peuvent donc s'assembler en un super-réseau incluant la quasi-totalité des gènes pris en compte par le logiciel pour cette comparaison (Figure 13). Il apparaît ainsi que plusieurs voies de signalisation sont affectées lors de la réversion du phénotype des cellules HZR. Parmi elles figurent des voies activées par des récepteurs (estrogènes, acide rétinoïque, cytokines (TNF, IL4, IL7)...). Ces voies ont donc pour caractéristiques communes de répondre à des stimuli extracellulaires, tels que la manipulation de zinc appliquée ici, et de contrôler beaucoup de fonctions cellulaires, telles que la morphologie et l'adhésion cellulaires, la différenciation, etc... Ces voies impliquent souvent les MAPK (voir Introduction III-5). Le calcium et l'AMP cyclique participent à leur fonctionnement.

Malheureusement l'ensemble de ces activités de régulation ne sont pas connues dans tous leurs détails et, le seraient-elles, leurs cibles se comptent par dizaines ou centaines de substrats. Aussi, il ne semble pas possible au vu de ces résultats de déterminer quels éléments précis contribuent au phénotype des cellules HZR. Cependant, cette étude transcriptomique permet de déduire que c'est probablement la fonction d'un processus de régulation/signalisation qui provoque l'apparition de ce phénotype. Même s'il est possible d'envisager que les événements qui en sont directement responsables se produisent au niveau post-transcriptionnel, au moins l'une des voies de signalisation identifiées dans cette analyse participe certainement au phénomène. Cette conclusion est en accord avec la réversibilité du phénotype en manipulant la concentration de zinc, qui ne pourrait se produire suite à une mutation d'un gène particulier impliqué dans la prise en charge des métaux, ou autre événement irréversible.

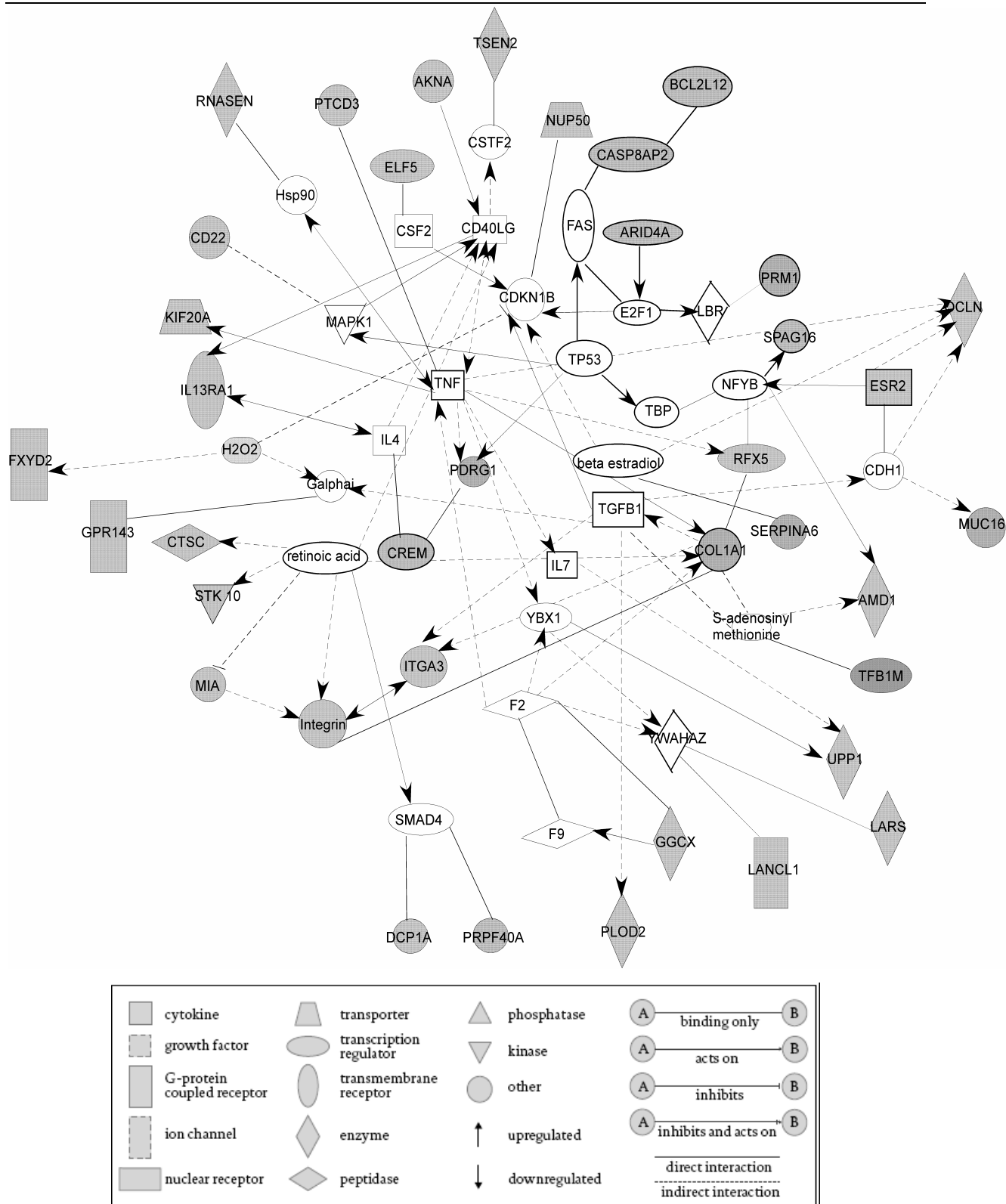


Figure IV-13 : Super-réseau simplifié de gènes participant au phénotype HZR. Les gènes figurant en grisés correspondent à ceux de notre analyse, les autres sont ceux rajoutés par le logiciel Ingenuity afin d'obtenir un réseau de gènes interagissant entre eux. Le sens de variation des gènes n'est pas spécifié (se reporter au tableau IV-1). Les traits pleins signifient une interaction directe, les traits pointillés, une interaction indirecte.

IV-5.9 Analyse globale des gènes régulés en présence de cadmium dans les cellules HZR.

a) ajout de cadmium aux cellules cultivées en présence de zinc :

La comparaison des différentes conditions en présence de cadmium montre que l'ajout de cadmium sur des cellules HZR cultivées en présence de zinc (ligne 3 du Tableau IV-6) donne des gènes qui sont organisés en 5 réseaux de plus de 10 gènes chacun. Dans le super-réseau formé par les réseaux locaux (Figure 14), on y retrouve des voies déjà apparues par variation de la concentration en zinc, comme celle rassemblant des gènes régulés par l'acide rétinoïque, le TNF et le β -estradiol, avec l'implication de MAPK (p38), et une dépendance vis-à-vis du calcium (via la calmoduline) et du cAMP (via l'adénylate kinase).

Parmi les nouvelles voies de signalisation révélées dans ces conditions par rapport à la seule manipulation du zinc (IV-5.8) figurent certaines activées par, ou ciblant, FOS, CTNNB1 (catenin), INFG (interféron γ) et PTH (hormone parathyroïde).

Ce nombre élevé de voies sensibles à des effecteurs extracellulaires est à rapprocher du grand nombre de gènes codant pour des récepteurs de la membrane plasmique et, moins spectaculairement, pour des transporteurs et des canaux ioniques identifiés dans ces conditions, mais pas nécessairement organisés dans des réseaux ou listés dans le Tableau IV-5. Parmi les récepteurs, on trouve HLA-DPB1, (sous-unité β du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II), GLP2R (*glucagon-like peptide 2 receptor*), TNFRSF8 (de la famille des récepteurs du TNF), FCRLM1 (*Fc receptor-like*), TFRC (récepteur de la transferrine), NARG2 (*NMDA receptor regulated gene 2*), GRK4 (*G-protein-coupled receptor kinase 4*) et beaucoup d'autres. Parmi les canaux et transporteurs, on note SLC13A1 et SLC26A8 (symports sodium-sulfate), SLC26A2 (transporteur sulfate), SLC01B3 (*solute carrier organic anion transporter family*), SLC9A1 (antiport sodium-proton régulé, entre autres, par la calmoduline et l'anhydrase carbonique II) ou TRPC4AP (protéine associée au *transient receptor potential channel 4*). Cette multiplicité de candidats ne permet pas, sur les seuls critères utilisés ici, de désigner aisément quels flux ioniques sont particulièrement affectés par l'exposition au cadmium. Il est aussi assez remarquable que peu de produits des gènes mentionnés soient impliqués dans les flux de cations, sauf quelques-uns concernés par le calcium ou le sodium. Rappelons ici que nous n'avons pas mesuré des changements très marqués pour ces métaux dans les cellules HeLa ou HZR exposées au cadmium (Chapitre 1).

b) manipulation du zinc sur des cellules exposées au cadmium

Dans cette comparaison quatre réseaux ont été détectés avec environ 14, 13, 11 et 5 gènes. Ils ont été assemblés dans un 'super-réseau' qui ne se distingue pas fondamentalement de ceux évoqués précédemment. On y retrouve au contraire des portions de voies de signalisation dépendantes de TNF, IL4, RAR/RXRA, etc. Il fait aussi apparaître MAPK1/ERK2 et des gènes associés à l'apoptose comme Casp9 et BIRC6 (*baculoviral IAP repeat-containing 6* dont le produit contient un domaine BIR-*baculoviral inhibition of apoptosis protein repeat*- et un domaine de conjugaison à l'ubiquitine-enzyme E2-) avec donc une dépendance vis-à-vis de l'ubiquitine.

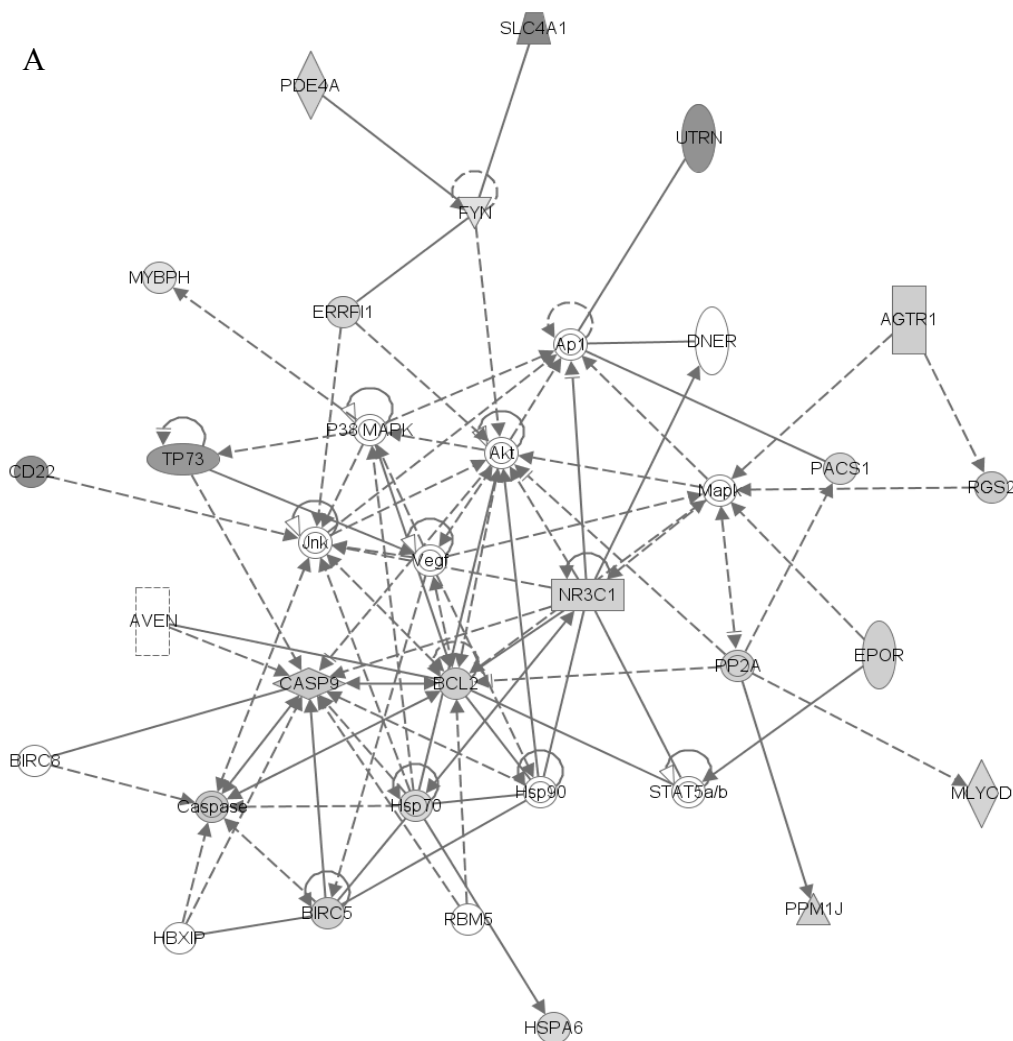
Ainsi les combinaisons Cd+Zn/Zn et Cd+Zn/Cd ne dégagent pas de différences suffisantes pour facilement distinguer les deux métaux et elles rendent probablement compte d'un effet de dose des cations puisqu'ils sont appliqués à 200 et 100 μM , respectivement, dans les conditions de ces deux comparaisons. Comme nous savons qu'une grande différence entre ces métaux appliqués aux cellules HZR est que le zinc pénètre abondamment alors que l'entrée de cadmium est évitée (Chapitre 1), la nature similaire des réseaux apparus dans ces conditions suggère fortement que la réponse cellulaire à l'exposition s'organise, en grande partie, à partir de la détection des cations extracellulaires. Une seule exception à cette remarque est la surexpression de la γ -glutamyl-transférase (gène GGT1) dans la condition 100 μM zinc + 100 μM cadmium par rapport à seulement 100 μM zinc. Il s'agit sans doute là de la manifestation du besoin accru de glutathion pour protéger certaines fonctions thiolates cruciales en présence de cadmium, tel qu'abordé dans le Chapitre 1. Cependant ce gène n'apparaît que dans la seule condition avec 200 μM cumulés de cations.

c) substitution du zinc par le cadmium

Un couple de conditions dans lesquelles la concentration de métal (zinc ou cadmium) extracellulaire reste constante est celui dans lequel le zinc du milieu des cellules HZR (100 μM) a été substitué par du cadmium (100 μM aussi) pendant 24h. Si ce n'est les concentrations appliquées, inférieures à celles des études présentées auparavant pour garder une viabilité suffisante, cette comparaison doit rendre compte de la plupart des conditions mise en œuvre dans ce travail.

Dans cette comparaison quatre réseaux ont été détectés avec environ 19, 18, 15 et 10 gènes (Figure 15 resp A, B et C). Le réseau faisant figurer les 15 gènes n'est pas montré car les remarques ci-dessous comprennent les gènes concernés par ce réseau. Pour chacun des réseaux individuels, on y retrouve des voies déjà évoquées précédemment, rassemblant des gènes régulés par le TNF et le β -estradiol, avec l'implication de MAPK (JNK, p38 et Akt) très marquée dans un réseau (A) ainsi que les associations à l'apoptose avec la présence de Casp9, BCL2. Cette condition met également en évidence une voie de signalisation activée et / ou dont la cible est également CTNNB1 (catenin) qui a été révélée sur des cellules stressées au cadmium et en présence de zinc.

Ces réseaux ont des rôles établis dans la prolifération cellulaire et l'apoptose. Il est donc concevable que leurs variations aient un lien avec l'augmentation de la mort cellulaire par apoptose des cellules HZR en présence de cadmium et le peu de survie cellulaire au-delà de 24 h enregistré dans ces conditions (voir Chapitre 1).



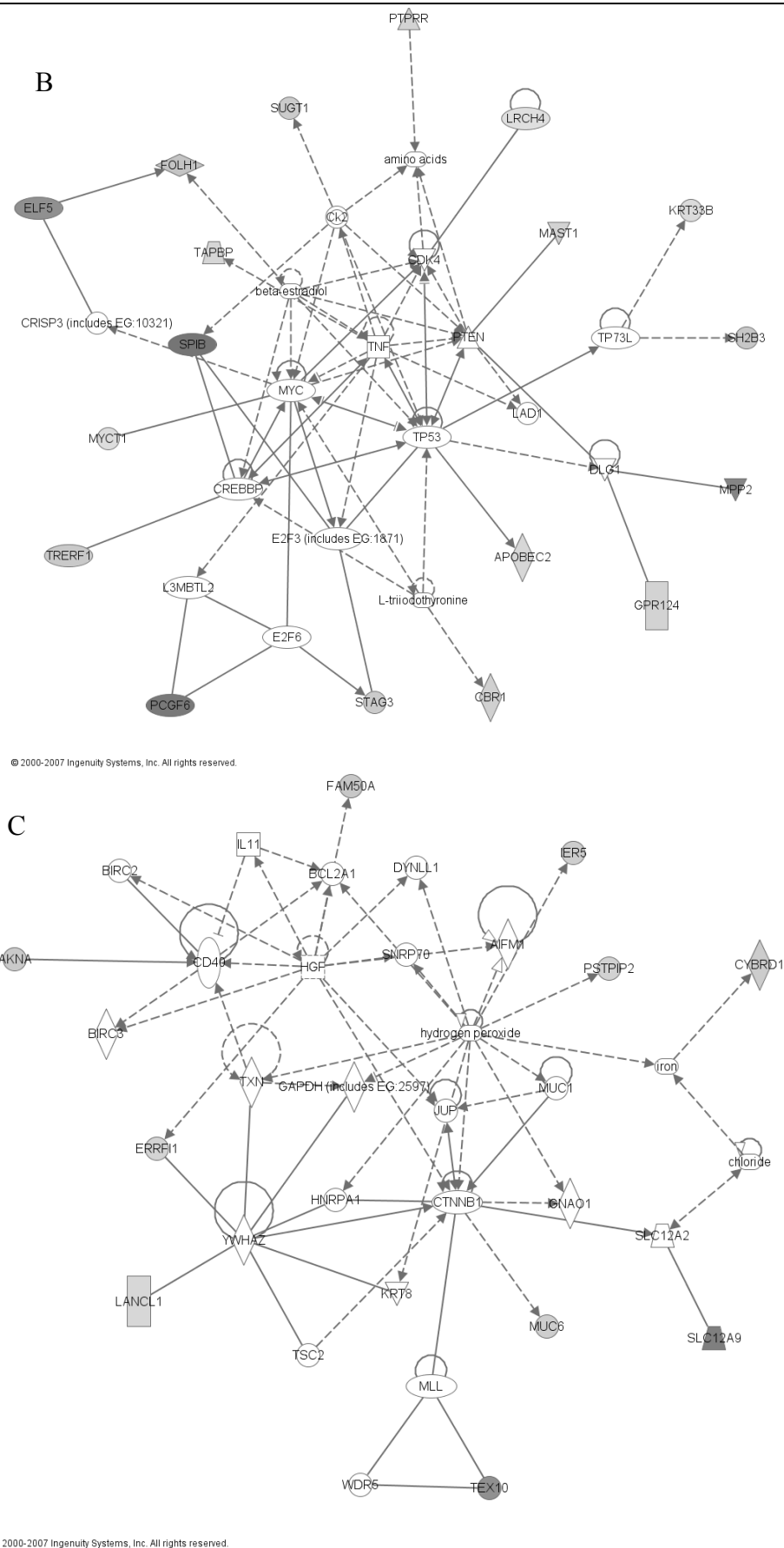


Figure IV-15 : Réseaux individuels de gènes correspondant à la substitution du zinc par le cadmium.

IV-5.10 Examen de gènes non inclus dans des réseaux biologiques

Il nous a semblé utile d'examiner les gènes n'ayant pas fait l'objet d'une classification par la suite logicielle *Ingenuity Pathways Analysis*, mais qui varient sensiblement au moins dans un couple de conditions. L'immense majorité d'entre eux correspond à des gènes très mal caractérisés et non pris en compte par ce logiciel. L'analyse détaillée '*in silico*' de chacun d'entre eux n'a pas été faite, et un progrès sensible dans leur connaissance ne pourra venir que d'une approche expérimentale les ciblant.

Restent les gènes relativement bien connus et non associés à des réseaux. Une bonne partie d'entre eux peuvent encore (comme la plupart de ceux reconnus dans les réseaux ci-dessus) être rapprochés de voies de signalisation. Par exemple, les conditions avec cadmium ou sans zinc font apparaître des gènes (SLC7A2, PRMT6, RARSL) dont les produits agissent sur l'arginine, substrat des NO synthases, et donc potentiellement en lien avec la signalisation NO-dépendente. De nombreuses autres fonctions biologiques sont suggérées mais seulement par un très petit nombre de gènes, ce qui ne permet pas d'accorder une importance à ces aspects sans investigations supplémentaires. Il s'agit par exemple des processus de maturation des messagers, de trafic intracellulaire ou de changement de morphologie.

En l'état de notre analyse, ces gènes laissés pour compte par la suite logicielle utilisée ne nous informent pas beaucoup sur l'origine du phénotype observé pour les cellules HZR.

IV-5.11 Conclusion : Caractéristiques générales de l'analyse transcriptomique globale réalisée pour les cellules HZR.

Pris dans leur totalité, les résultats de ces études transcriptomiques font apparaître quelques éléments très nets.

Contrairement à l'impression initiale donnée par l'examen rapide des gènes retenus dans chaque couple de conditions (voir IV-5.6), les voies biologiques mises en évidence par cette analyse sont à peu près les mêmes dans toutes ces circonstances correspondant aux manipulations des cations zinc et cadmium sur les cellules HZR.

L'observation la plus frappante est en effet la domination de voies de signalisation très diverses dans les différentes conditions testées. Le fait de voir des réponses cellulaires de ce type en manipulant le zinc et le cadmium n'est pas une surprise en soi (voir Introduction).

Ce qui l'est plus est la quasi-absence de remodelage de voies métaboliques. Celles-ci sont incluses dans la base de connaissances de la suite logicielle utilisée, mais aucune n'est apparue de façon significative dans les réseaux constitués. Ceci s'explique d'abord par le relatif petit nombre de gènes codant pour des enzymes étant différentiellement exprimés dans les divers couples de conditions. Ensuite, certains de ces enzymes participent au fonctionnement de voies de signalisation. Dans cette catégorie figurent UPP1 (uridine phosphorylase), GGCX (γ -glutamyl carboxylase), MLYCD (malonyl-CoA decarboxylase), des phosphatases, des kinases, des peptidases et d'autres catégories d'hydrolases et d'enzymes de modification. Ainsi, les activités connues, sans rapport immédiat avec les effets de signalisation, sont très rares. Nous n'avons relevé que la cytochrome b5 réductase réprimée par 100 μ M zinc+100 μ M cadmium, et une seule sous-unité des complexes NADH-ubiquinone oxoreductase et pyruvate deshydrogénase réprimée et induite, respectivement, par substitution du zinc par le cadmium.

Il s'agit là des seules activités directement liées à une réaction redox trouvées dans notre analyse. Il a été longuement détaillé dans les Chapitres précédents que l'exposition au cadmium ou les effets du zinc contribuent à des déséquilibres de l'homéostasie redox. Sur la base des résultats présentés ici, la réponse des cellules HZR aux changements des concentrations de ces cations n'implique pas beaucoup de gènes participant directement au maintien de cette homéostasie, au moins dans les conditions que nous avons utilisées. Cette conclusion peut même être étendue à l'ensemble des voies métaboliques. Somme toute, ce dernier point est en accord avec le fait que les conditions appliquées l'ont été de sorte que la viabilité des cellules soit maintenue. Il y a donc très peu de perturbations qualitatives du fonctionnement métabolique dans ces conditions, mais plutôt ce qui pourrait être interprété comme une adaptation par l'intermédiaire d'activation/répression de voies de signalisation (voir aussi plus loin).

Parmi les éléments qui transparaissent dans les résultats obtenus figure un grand nombre de gènes codant pour des protéines dites 'à doigts de zinc' plus ou moins bien caractérisées. Comme ces structures sont d'importance dans les interactions protéine-ADN et protéine-protéine, il s'agit peut-être là d'une simple conséquence de la forte représentation des voies de signalisation, faisant largement appel à ces structures, dans nos résultats. Cependant, une autre possibilité, rarement démontrée dans la littérature, est que les manipulations des cations zinc et cadmium influent sur la concentration de ces domaines, via leur stabilité ou l'expression de

leur gène. Cela ne saurait être un effet uniforme puisque nous n'avons pas identifié **tous** les domaines à 'doigts de zinc' dans cette analyse transcriptomique (le cas de MTF-1 et de ses structures de ce type a été largement mentionné dans ce travail, en particulier en IV-5.4). Ainsi, il est envisageable que certaines de ces structures puissent jouer le rôle de *senseurs* de ces cations, mais cette question n'a pas été traitée dans ce travail.

L'écrasante prépondérance de diverses voies de signalisation dans les résultats de cette analyse transcriptomique indique que les cellules HZR s'adaptent à la concentration en zinc ou cadmium par cet intermédiaire. Il est inéluctable que certaines d'entre elles soient activées ou réprimées en conséquence de la présence en quantité de ces cations, sans participer au processus d'adaptation/résistance, par l'intermédiaire d'autres signaux. Mais il est probable aussi que l'une, ou plusieurs, d'entre elles ait un effet causatif assurant ce processus d'adaptation/résistance. La question qui demeure est de savoir laquelle joue ce rôle mais les données obtenues autorisent de spéculer sur ses caractéristiques. La forte représentation de gènes codant pour des récepteurs ou des protéines associées suggère fortement un mécanisme d'initialisation à la membrane plasmique. Ceci n'est pas nouveau pour les effets du zinc (Azriel-Tamir et al., 2004) ou du cadmium, ainsi que d'autres cations comme le calcium (Chang and Shoback, 2004). Pour le cadmium, sa capacité à mimer certaines hormones et à interagir avec leur récepteurs a déjà été démontrée, comme dans le cas des estrogènes (Johnson et al., 2003) ou des glucocorticoïdes (Elez et al., 2001; Min et al., 2002). Ce type de récepteur a effectivement été trouvé dans nos expériences, mais celles-ci laissent penser que d'autres récepteurs, restant encore à caractériser pour la plupart, pourraient avoir un rôle dans l'adaptation des cellules HZR à de fortes concentrations de zinc et dans leur résistance transitoire vis-à-vis de l'import de cadmium.

CONCLUSION GENERALE

La prise de conscience des conséquences de la pollution environnementale sur la santé humaine ces dernières années, a relancé l'intérêt de la toxicologie environnementale concernant, entre autres, les problèmes sanitaires liés aux métaux lourds comme le cadmium. L'intérêt de l'étude de la toxicité de ce métal est dû à sa large utilisation technologique pouvant provoquer des risques d'intoxication élevés. Ce polluant, comme la plupart, se transmet et s'accumule tout le long de la chaîne alimentaire, et n'est que très faiblement excrété ce qui attire l'attention sur les contaminations chroniques. Cela aboutit ainsi à des concentrations très élevées dans les derniers maillons de la chaîne alimentaire, provoquant diverses pathologies.

Le cadmium a été classé comme un cancérigène de catégorie 1 par inhalation. Il est aussi raisonnable de penser que ce métal peut provoquer d'autres cancers au niveau du rein, des testicules, du pancréas et de la prostate.

Au niveau cellulaire, le cadmium induit d'importants dommages parmi lesquels les lésions hépatiques, rénales, des perturbations érythropoïétique et du processus de calcification/décalcification du squelette. Pour des expositions prolongées un remodelage osseux a été observé dans le cas de la maladie *Itai-Itai* au Japon par exemple. De plus, ce métal a été montré comme perturbant les homéostasies d'autres métaux essentiels comme le fer, le zinc ou le calcium.

L'objectif de ma thèse a été de participer à l'étude des mécanismes de toxicité du cadmium qui sont complexes, et la stratégie adoptée pour aborder cette complexité a principalement été l'utilisation d'une lignée résistante au zinc, HZR, dérivée de la lignée épithéliale humaine HeLa. En effet, une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la résistance des cellules HZR vis-à-vis de ce métal, et donc des voies particulièrement sensibles à ce toxique, permettrait une anticipation des effets délétères lors d'une intoxication, ainsi que la mise en place de systèmes curatifs. Pour atteindre cet objectif particulièrement ardu en raison de la diversité des dommages biologiques provoqués par le cadmium, et d'éclaircir ainsi les mécanismes de toxicité de ce métal, plusieurs approches expérimentales ont été utilisées. Ainsi, il a été possible d'apporter plusieurs éléments inédits dans la compréhension des mécanismes de résistance des cellules HZR, et au-delà des cellules humaines en général, vis-à-vis du cadmium.

ETUDE DES MECANISMES DE RESISTANCE DES CELLULES HZR VIS-A-VIS DU CADMIUM

Dans la littérature, les travaux antérieurs effectués sur l'étude des causes de la résistance au cadmium ont utilisé une acclimatation à des concentrations croissantes de cadmium (Cigliano et al., 1996; Croute et al., 2005; Hatcher et al., 1995; Himeno et al., 2002; Lau et al., 2006; Leslie et al., 2006; Yanagiya et al., 2000), ce qui a permis de mettre en évidence des mécanismes très variés impliquant les métallothionéines ainsi que la protection accrue du réticulum endoplasmique et la tolérance vis-à-vis des processus apoptotiques. Dans ce contexte, nous avons choisi d'utiliser un modèle différent des précédents, constitué des cellules HeLa progressivement acclimatées à des concentrations croissantes de zinc et donc résistantes à de fortes concentrations de zinc (Chimienti et al., 2001). Ce modèle nous offre la possibilité d'étudier les interactions entre l'homéostasie du zinc et sa perturbation par le cadmium et ainsi de mettre en évidence des mécanismes pas obligatoirement actifs dans les précédentes études. Une des caractéristiques importantes de ce modèle est que le phénotype qu'il présente est réversible par manipulation de la concentration de zinc à laquelle les cellules sont exposées. Nous avons d'abord mis en évidence que les cellules HZR qui sont fortement résistantes vis-à-vis du zinc l'étaient également vis-à-vis du cadmium contrairement aux cellules HeLa sensibles aux deux métaux. Cependant, la résistance de cellules HZR vis-à-vis du cadmium n'est que transitoire, contrairement à celle du zinc, ce qui permet de dire que les deux métaux ne sont pas pris en charge de manière identique dans cette lignée. Nous avons cherché à décrypter les causes ainsi que les mécanismes à l'origine de la résistance des cellules HZR, et nous avons montré qu'elle n'était pas due à une forte induction de protéines de réponse au choc thermique (Hsp) (Chapitre 3, courbes de viabilité en présence de tunicamycine et de cadmium). De même les métallothionéines, ainsi que l'acclimatation au zinc pouvant les induire, n'étaient certainement pas un acteur principal de la résistance vis-à-vis du cadmium, dès lors que les cellules HeLa maintenues pendant une semaine dans 100 μM de zinc ne présentent pas de résistance remarquable vis-à-vis du cadmium (Chapitre 1, article 1). Il a par contre été montré que la résistance au cadmium des cellules HZR est due à la limitation de l'entrée de ce toxique (Chapitre 1, article 1) dans les cellules HZR contrairement aux cellules HeLa. Cela a déjà été décrit dans des cellules acclimatées en présence de cadmium (Himeno et al., 2002). Les quelques études fonctionnelles réalisées, notamment par imagerie des flux cationiques ont montré qu'aucune des voies d'entrée du cadmium, à ce jour

répertoriés (Gavazzo et al., 2005; Hinkle et al., 1987; Souza et al., 1997; Usai et al., 1999) n'étaient impliquées dans les cellules HZR. De plus, les niveaux d'expression des transcrits de deux candidats, à savoir la sous-unité d'un canal voltage-dépendant de type T, $\text{Ca}_v\alpha_{1G}$ (Leslie et al., 2006), et Zip8 (Dalton et al., 2005) ne sont pas significativement différents dans les deux lignées cellulaires HZR et HeLa dans les conditions basales, ce qui les écarte des voies d'entrée impliquées dans la résistance des cellules HZR. Enfin, il a été décrit dans la littérature que le cadmium pouvait entrer dans les cellules par une voie prenant en charge le manganèse (Himeno et al., 2002; Martin et al., 2006a). Or les expériences d'imagerie des flux cationiques effectuées en présence de manganèse ne sont pas concluantes ; en effet la possibilité de diminution de fluorescence de la sonde Fluo-4 en présence de manganèse ne peut être exclue (Chapitre 1 figure 4). Afin d'éclaircir ce point, des expériences de mesures intracellulaires de cadmium en présence de deux concentrations de manganèse sont très prochainement envisagées.

Il apparaît donc clairement qu'aucun des candidats précédemment décrits dans l'entrée de cadmium ne semble responsable de la résistance des cellules HZR vis-à-vis de ce métal. Ainsi nous montrons que les interactions entre le cadmium et les cellules de mammifères ne sont pas encore parfaitement décrites. Pour pouvoir caractériser l'entité moléculaire responsable de l'entrée de cadmium dans les cellules HeLa nous avons mis en œuvre une étude transcriptionnelle avec les cellules HZR (Chapitre 4). Parmi les gènes différentiellement exprimés entre les conditions avec et sans zinc, peu étaient clairement susceptibles d'être impliqués dans la limitation de l'entrée de cadmium. FXYP2 codant pour une sous-unité régulatrice du transporteur de sodium et potassium semblait cependant prometteur. Toutefois les résultats indiquent (Chapitre 4 partie IV-5. 5) que ce candidat ne soit pas entièrement responsable de la limitation de l'entrée de cadmium dans les cellules HZR. De l'étude transcriptomique réalisée, aucun candidat particulier impliqué dans le transport ou agissant comme une sous-unité régulatrice d'un transporteur quelque soit sa nature n'a clairement été mis en évidence pour expliquer le phénotype particulier d'inhibition de l'import de cadmium présenté par les cellules HZR. Nous en concluons, au moins provisoirement puisque des gènes non annotés issus de notre analyse restent à caractériser, que le phénotype des cellules HZR n'est pas déterminé par une régulation transcriptomique directe d'un gène participant au transport de cadmium. Par contre, si l'on considère les gènes identifiés dans leur globalité on voit se dessiner des voies de signalisation, activées par des stimuli externes, comme l'application de zinc ou de cadmium, par l'intermédiaire de récepteurs (estrogènes, acide

rétinoïque, TNF) à la membrane plasmique. Ces voies contrôlent toutes les grandes fonctions biologiques (prolifération, morphologie, adhésion, différenciation...) et impliquent un nombre de gènes très important qu'il n'est pas possible de hiérarchiser dans leur influence sur le phénotype étudié.

EFFETS DU CADMIUM INTRACELLULAIRE DANS LES DEUX LIGNÉES HeLa et HZR.

Prise en charge similaire du cadmium intracellulaire dans les deux lignées

Nous avons également cherché à comprendre ce qu'il advenait du cadmium une fois dans la cellule et comment ce métal était pris en charge dans les deux lignées cellulaires. Il apparaît que la prise en charge de ce métal est semblable pour les deux lignées. En effet, si l'on étudie divers paramètres à une concentration intracellulaire de cadmium identique, on obtient des résultats comparables concernant, par exemple, la localisation ou le rôle du glutathion. Celui-ci est important puisque l'inhibition de sa synthèse est suivie d'une perte de viabilité vis-à-vis du cadmium pour les deux lignées. Cependant, la complexation de cadmium par le glutathion n'est pas un substrat majeur de certaines pompes d'efflux comme les MRP (chapitre 1, article 1). Enfin, les processus d'oxydation des acides nucléiques ainsi que des protéines ne sont pas des événements précoces de la toxicité de ce métal (Chapitre 1, article 1) contrairement à certains résultats obtenus dans la littérature sur d'autres systèmes biologiques (Mouron et al., 2001; Potts et al., 2001) montrant que l'application de cadmium était suivie de dommages à l'ADN.

Perturbation de l'homéostasie calcique par le cadmium

Une différence importante entre les deux lignées mise en évidence par imagerie calcique consécutive à l'application de thapsigargine est la relativee modestie des stocks calciques du réticulum endoplasmique des cellules HeLa. La plus grande abondance des stocks calciques dans les cellules HZR en comparaison aux cellules HeLa a été confirmée par application d'ionomycine (Chapitre 1, figures I-5 et I-6). Ainsi la distribution de calcium est différente entre les cellules HZR et les cellules HeLa. Sa perturbation suite à l'application de thapsigargine pendant 24 heures sensibilise considérablement les cellules HZR en présence de

cadmium (Chapitre 3, figure 4B). Ces observations sont à mettre en regard avec le type de mort privilégié des cellules HZR par rapport aux cellules HeLa qu'est l'apoptose (Chapitre 1, article 1). Cet état de mort préférentiel chez les HZR est d'ailleurs renforcé par l'analyse transcriptionnelle qui révèle des variations d'expression de gènes appartenant aux voies des caspases dans les cellules traitées au cadmium par rapport aux cellules en présence de zinc (Chapitre 4, paragraphe IV-5.8).

La mitochondrie est un site majeur de la régulation de l'apoptose faisant intervenir les membres de la famille de Bcl-2, protéine ayant un rôle anti-apoptotique. Ce n'est que récemment que le rôle du réticulum endoplasmique (RE), principal réservoir de Ca^{2+} , vis-à-vis de l'apoptose a été discuté bien qu'il soit connu que Bcl-2 est localisé au RE et que l'homéostasie du Ca^{2+} intracellulaire est perturbée lors de l'apoptose. Une revue récente illustrant le lien entre la perturbation de l'homéostasie calcique dans le RE et l'apoptose est disponible (Pinton and Rizzuto, 2006). La cascade de caspases peut être activée directement à partir du RE, par exemple lors d'un stress par application de thapsigargine qui provoque la libération massive de calcium, ce qui aboutit ensuite à la mort cellulaire par activation de la caspase 9 (Sun et al., 1999) via la libération du cytochrome c de la mitochondrie (Arnaudeau et al., 2002).

Le processus apoptotique peut également court-circuiter la mitochondrie, lors de l'initiation par la liaison de cytokines sur leur récepteur spécifique, par exemple le récepteur au $\text{TNF}\alpha$, qui est le nœud central de toutes les conditions testées, ce qui va déclencher une cascade de réactions conduisant la cellule vers l'apoptose. Le domaine cytosolique du récepteur de $\text{TNF}\alpha$ porte un domaine de mort appelé TRADD qui permet de recruter une caspase initiateur, la caspase 8. La pro-caspase 8 comporte un long domaine qui contient des motifs DED (*Death Effector Domain*) permettant une interaction spécifique avec TRADD/FADD. Lors de l'activation, le pro-domaine est protéolysé et la caspase 8 active se dissocie du complexe membranaire (Wolf and Green, 1999). La caspase 8 cible principalement la pro-caspase 3 qui est l'exécutant principal du mécanisme d'apoptose. Une fois la caspase 3 activée, celle-ci est responsable des dommages cellulaires liés à l'apoptose. Le mécanisme d'apoptose initié par $\text{TNF}\alpha$ implique également la voie de signalisation de JNK (Introduction III-5 d).

Ainsi il serait intéressant de mesurer la quantité de cadmium intracellulaire en présence de concentrations sub-létales de thapsigargine dans les deux lignées cellulaires pour s'assurer de l'effet de la perturbation de l'homéostasie calcique au niveau du réticulum endoplasmique sur l'entrée de cadmium.

Le cadmium déclenche-t-il la réponse UPR ?

L'étude protéomique a permis de montrer que seulement un nombre très restreint de protéines participaient aux différences de production de protéines observées entre les deux lignées cellulaires. Parmi les candidats apparaissaient la protéine Hop, qui nous a orienté vers une investigation de la sensibilité du réticulum endoplasmique en présence de cadmium. Les résultats obtenus nous montrent qu'en présence de cadmium, les cellules HZR sont beaucoup plus sensibles à la thapsigargine qu'à la tunicamycine. Même si ces deux drogues induisent un stress au niveau du réticulum endoplasmique aboutissant à la réponse UPR, il est légitime de penser que les cellules HZR ne présentent pas un niveau latent de réponse UPR élevé puisque leur sensibilité au cadmium en présence de tunicamycine est bien moindre que celle en présence de thapsigargine. De plus, aucune des protéines Grp78, Grp94 ou PDI participant à la réponse UPR ne sont sur-produites dans les cellules HZR à l'état basal. Cependant pour s'assurer formellement de cela il serait utile de vérifier les niveaux d'activation de trois acteurs majeurs de la réponse UPR que sont Ire1, PERK et ATF6 et de vérifier si l'épissage alternatif de l'ARNm de la *X-box binding protein* a eu lieu (Iwawaki et al., 2004) (Introduction, paragraphe III-4 b).

Rôle de la HPPD vis-à-vis d'un stress cadmium

Enfin, parmi les protéines sur-exprimées dans les cellules HZR et qui participent au phénotype particulier des cellules HZR, la HPPD a été mise en évidence, ce qui était tout à fait inattendu et inédit (Chapitre 3). Les viabilités obtenues en présence d'inhibiteur de l'HPPD et de fortes concentrations de tyrosine, vis-à-vis du cadmium, ne sont pas additives pour les cellules HZR. Cela suggère que l'augmentation de la concentration de tyrosine ou l'inhibition de l'HPPD agissent sur la résistance ces cellules HZR vis-à-vis du cadmium par des mécanismes distincts. Parmi les produits dérivés de la tyrosine figure la mélanine. Comme il a été mentionné au chapitre 3, la mélanine est capable de lier les métaux (Kokkinou

et al., 2004; Szpoganicz et al., 2002), et peut être impliquée dans des processus de détoxification (Loumbourdis and Vogiatzis, 2002; Nicolaus, 2005). L'importance de la mélanine dans les cellules HZR est de plus appuyée par le fait que l'étude transcriptomique révèle un gène GPR 143 qui est considéré comme un récepteur couplé aux protéines G présent à la membrane des mélanosomes mais qui est mieux connu sous le nom de OA1 (*ocular albinism*). Cette protéine est réprimée dans la condition avec zinc (HZR en présence de 100 μ M) par rapport à la condition sans zinc. L'albinisme oculaire est provoqué par un défaut de mélanosomes, les organites dans lesquels la mélanine est synthétisée. Dans la peau des patients atteints d'albinisme oculaire, la mélanine est synthétisée mais s'accumule dans les mélanosomes (Innamorati et al., 2006). Ainsi, nous pouvons proposer que le récepteur GPR143 est un candidat pouvant rendre compte du phénotype des cellules HZR : sa répression en présence de zinc pourrait influencer sur la distribution cellulaire de zinc ou de cadmium. Cette hypothèse, encore vague, n'a été formulée que très tardivement sur la base des études protéomiques (Chapitre 3) et transcriptomiques (Chapitre 4) dans cette thèse et elle n'a pas pu être testée expérimentalement. Il apparaît donc important d'analyser plus avant le rôle de la mélanine dans les cellules HZR car la discussion ci-dessus alimente la possibilité de relations, jusqu'alors non considérées, de la prise en charge de métaux divalents, et de cadmium en particulier, par la mélanine, le tout impliquant les voies cataboliques de la tyrosine.

Voies de signalisation privilégiées dans les mécanismes de régulation du zinc et du cadmium chez les cellules HZR

Finalement, il semble que dans chacune des études effectuées, que ce soit au chapitre 1, 2 ou 4, la perturbation de l'homéostasie calcique par le cadmium ainsi que l'importance de la signalisation calcique soit un thème récurrent concernant la prise en charge du cadmium dans les cellules HZR. Ainsi, l'étude transcriptomique abordée au chapitre 4 concernant les conditions pour lesquelles le zinc du milieu des cellules HZR (100 μ M) a été substitué par du cadmium (100 μ M aussi) pendant 24h ont mis en évidence quatre réseaux de gènes. De ces réseaux se dégagent l'implication des MAPK (p38 et ERK), et une dépendance vis-à-vis du calcium (via la calmoduline) et du cAMP (via l'adénylate kinase). Cela avait déjà été décrit dans la littérature (Chuang et al., 2000; Coutant et al., 2006; Galan et al., 2000; Hirano et al., 2005; Hung et al., 1998; Iryo et al., 2000; Kim et al., 2005; Wang and Templeton, 1998).

Toutefois aucune étude aussi globale et homogène, c'est-à-dire présentant les effets respectifs des deux métaux zinc et cadmium sur des durées d'exposition de 24 heures pour le cadmium, n'a été présentée en détail. Il apparaît donc essentiel d'affiner les diverses pistes qui s'offrent par analyse fonctionnelle de l'effet de l'inhibition de ces voies dépendant du calcium pour les hiérarchiser dans l'établissement des causes et des conséquences du phénotype des cellules HZR. De plus, nous voyons nettement que les nœuds principaux de ces diverses réseaux sont constitués de MAPK, notamment p38 et ERK, mais que des variations de l'expression de ces gènes n'apparaissent pas. Ainsi, les amorces d'analyse globales faites dans ce travail ne sont pas encore suffisantes pour offrir une vision exhaustive et détaillée de la réponse d'un type cellulaire particulier à un toxique tel que le cadmium. Pour cela, elles devraient être complétées par des analyses du même type au niveau post-transcriptionnel, telles que celles des protéines phosphorylées (phospho-protéome) ou autres modifications des protéines.

Néanmoins les travaux rapportés ici délimitent déjà les champs d'investigation les plus pertinents dans le contexte de la toxicité du cadmium, en particulier en relation avec l'homéostasie du zinc, chez les cellules de mammifères. Ils proposent les voies de réponse les plus sensibles à ce toxique et écartent d'autres phénomènes mis en évidence ou suggérés dans d'autres conditions (cellules et doses de toxique). Enfin, nos résultats attirent l'attention sur des interactions intracellulaires inédites de voies métaboliques ou de signalisation qu'il reste à caractériser. Ainsi, nos travaux mettent en évidence un nombre de lacunes dans la connaissance actuelle des réponses cellulaires aux toxiques, et ils indiquent donc que la stratégie d'étude de ces questions bénéficie déjà, et bénéficiera plus encore dans le futur, des outils d'analyse globale récemment développés et en devenir.

MATERIELS ET METHODES

MATERIELS ET METHODES

TAMPONS

- Tampon d'électrophorèse TBE : Tris Borate EDTA

89 mM Tris, 89 mM acide borique, EDTA 20 mM pH 8

- Tampon d'électrophorèse SDS-PAGE

25 mM Tris-Cl, pH 8.4, 0.2 M Glycine, 0.1% SDS

- Tampon de transfert pour immuno-empreinte

25 mM Tris-Cl, 0.2 M Glycine, 10% Méthanol, pH 9

- Tampon PBS

137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na₂HPO₄, 7 H₂O, 1.4 mM KH₂PO₄, pH 7.3

- Tampon PBS-T

0.1% Tween 20 dans PBS

- Solution Tyrode

121 mM NaCl; 5.4 mM KCl; 0.8 mM MgCl₂; 1.8 mM CaCl₂; 6 mM NaHCO₃; 5.5 mM D-glucose; 25 mM Hepes (pH 7.3)

METHODES GENERALES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

Extraction de l'ADN par une solution de Phénol/Chloroforme/3-méthyl-1-butanol

L'ADN est séparé des protéines par extraction avec un volume de mélange Phénol/Chloroforme/3-méthyl-1-butanol (25 :24 :1). Après centrifugation 30 sec à 12 000xg, la phase organique est extraite par un volume d'eau. L'ensemble des phases aqueuses est précipité par 1/10 volume d'acétate de sodium 3 M + 2 volumes d'éthanol. Le mélange est placé 20 min à -80°C, puis centrifugé à 17 000xg 30 min à 4°C. Le culot est rincé par 2 volumes d'éthanol à 70%, puis les restes de solvant sont évaporés sous vide (RC10.10 Jouan).

Préparation de la sonde IRE en présence de traceur radioactif

Pour le dosage de l'activité des IRP de fixation aux IRE, une sonde d'ARN reprenant le motif en tige-boucle, est synthétisé *in vitro* en présence de 33P-UTP, nucléotide marqué avec l'isotope radioactif 33P, ayant une demi-vie de 0.249 MeV et 25.4 jours. 200 nM de matrice

d'ADN sont incubés dans 20 µl de tampon de transcription (en eau traitée DEPC) en présence de 1 mM ATP, 1 mM GTP, 20 unités d'inhibiteurs de ribonucléase de placenta humain (Sigma), 40 unités d'ARN polymérase du phage T7 et 60 µCi de 33P-UTP. Après 40 min d'incubation à 37°C, 0.5 mM d'UTP non marqué est ajouté et la synthèse poursuivie durant 5 min à 37°C. L'ARN synthétisé est placé dans 40 µl de tampon 80% formamide / 10 mM NaOH / 1 mM EDTA / 0.1% Bleu de bromophénol, et dénaturé 2 min à 85°C afin de détruire les structures secondaires. Il est purifié sur un gel dénaturant d'acrylamide (20% A/BA 19 :1 / 7 M urée / 0.5 x TBE). Le gel est à exposer sur un écran phosphorescent avant détection (PhosphorImager-Molecular Dynamics). Les bandes contenant la sonde IRE sont excisées et extraites par une solution 0.5 M acétate d'ammonium / EDTA 0.5 mM / SDS 0.1% pendant une nuit d'agitation. La sonde ARN est extraite au phénol et précipité à l'alcool. Les culots obtenus sont dissous dans 15 µl d'eau DEPC et conservés à -80°C.

METHODES GENERALES DE BIOCHIMIE

Dosage de la concentration des protéines

La concentration des protéines est déterminée par la méthode spectrophotométrique de Bradford (Bradford 1976) à l'aide du kit *BioRad Protein Assay* (BioRad). La méthode est basée sur la détection du complexe formé entre le colorant Coomassie Brilliant Blue G-250 et les protéines.

Dosage de la concentration d'ADN (ARN)

La concentration de l'ADN (ARN) s'effectue par spectrophotométrie à 260 nm, en considérant qu'une absorbance de 1, pour un trajet optique de 1 cm, correspond à 50 µg/ml d'ADN double brin (ou 40 µg/ml d'ARN simple brin).

Analyse des protéines sur gel dénaturant de polyacrylamide

50 µg d'extraits de protéines sont dénaturées pendant 2 min dans 62.5 mM Tris-Cl pH 6.8, 15% glycérol, 2.5% SDS, 10% 2-mercaptoéthanol, 0.001% bleu de bromophénol. La solution est chargée sur une superposition de deux gels dénaturants de polyacrylamide, l'un servant à séparer les protéines en utilisant le réseau de polyacrylamide comme tamis moléculaire, l'autre servant à concentrer les protéines.

Analyse des protéines par immuno-empreinte

La technique d'immuno-empreinte est mise en oeuvre après transfert des protéines sur une phase immobile (membrane de nitrocellulose). La membrane utilisée est placée en contact du gel de polyacrylamide, dans une cuve contenant le tampon de transfert, et un courant de 250 mA pendant 1h30 à 4°C est appliqué pour électro-transférer les protéines du gel sur la membrane.

CHAPITRE 1

Pour toutes les méthodes suivantes, voir Materials and Methods de l'article 1 chapitre 1, paragraphe I-4.

1.1 Cultures cellulaires

1.2 Détermination de la viabilité cellulaire

Tests non spécifiques

Par le bleu de trypan

Après lavage en tampon phosphate (PBS), les cellules sont récoltées par trypsination. Le nombre total de cellules est évalué par comptage en hémacytomètre après coloration des cellules dont la membrane plasmique est perméabilisée par le bleu de trypan.

Par le MTT

Tests spécifiques permettant la discrimination entre la nécrose et l'apoptose :

Coloration à l'acridine orange et au bromure d'ethidium.

1.3 Courbes de titrage de la sonde fluorescente BTC-5N en présence de zinc/cadmium

1.4 Localisation du cadmium intracellulaire par microscopie confocale

1.5 Mesure des cassures de l'ADN par la méthode des COMET

1.6 Mesure de la 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine

1.7 Détection des protéines oxydées

1.8 Mesure de la production d'espèces réactives de l'oxygène

1.9 Mesure du taux de glutathion

1.10 Mesure de la concentration intracellulaire de zinc et cadmium par

Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry

et par dosage fluorimétrique à l'aide de la sonde BTC-5N.

1.11 Mesure du taux d'expression des transcrits par RT-PCR semi-quantitative

1.12 Imagerie des flux cationiques

CHAPITRE 2

Pour toutes les méthodes suivantes, voir Materials and Methods de l'article 2 chapitre 2, paragraphe II-3.

2.1 Traitements cadmium administrés aux souris

2.2 Numération sanguine

2.3 Préparation des lysats à partir des organes de souris

2.4 Electrophoretic Mobility Shift Assay

2.5 Analyse des protéines sur gel dénaturant de polyacrylamide, transfert sur membrane de nitrocellulose et détection immunochimique d'IRP1 (Western-Blot)

CHAPITRE 3

Pour toutes les méthodes suivantes, voir Materials and Methods de l'article 3 chapitre 3.

3.1 Préparation des lysats cellulaires pour analyse par électrophorèse bi-dimensionnelle

3.2 Electrophorèse bi-dimensionnelle

3.3 Digestion des spots excisés

3.4 Real Time - Polymerisation Chain Reaction quantitative

CHAPITRE 4

4.1 Préparation des ARN pour hybridation sur puce.

Extraction et contrôle de la qualité des ARN

Pour chaque condition expérimentale ainsi que pour l'élaboration des échantillons de référence, les ARN totaux ont été extraits à l'aide du kit RNA PLUS™, (Qbiogene, France). Cette méthode est une amélioration du protocole initial proposé par Chomczynski (Chomczynski and Sacchi, 1987), qui consiste à complexer l'ARN par des ions guanidinium ce qui réduit les interactions électrostatiques avec les protéines. Les protéines et l'ADN se trouvent ainsi en phase organique et sont enlevées, tandis que l'ARN reste en phase aqueuse. Après extraction, une lecture de la densité optique à 260 nm permet de mesurer la concentration en ARN de chaque échantillon, qui est alors stocké à -80°C.

On estime que le rapport A260/A280 doit être supérieur à 1,8 si l'extrait d'ARN est correctement purifié. Le rapport A260/A230 doit être supérieur à 1,8 et indique le phénol résiduel qui absorbe à 230 nm. Nous considérons ces paramètres afin d'estimer la pureté de l'échantillon d'ARN total.

Nous vérifions également le profil des ARN totaux visualisé après électrophorèse sur un gel d'agarose et coloration au bromure d'éthidium (Figure IV-5). Chez les mammifères, nous observons deux bandes à 5 kb (ARNr 28S) et 2 kb (ARNr 18S).

Une dégradation partielle des ARN se traduit par l'apparition de fragments de faible taille. Dans ce cas, nous recommençons l'extraction car une telle dégradation conduit à l'obtention de données biaisées.

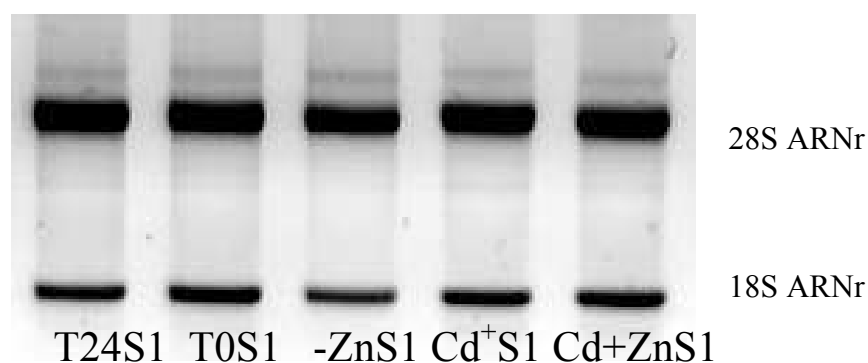


Figure IV-5 : Vérification de la qualité des ARN totaux par électrophorèse sur gel d'agarose
 (a) Lorsque les ARN sont correctement extraits, nous observons deux bandes de forte intensité correspondant aux ARNr 28S et 18S.
 (b) ARN partiellement dégradé. L'intensité des fragments de petite taille augmente, et nous voyons apparaître une traînée au bas du gel.

Amplification

Avant l'hybridation, les ARN (RH et expérimentaux) sont amplifiés à l'aide du kit MessageAmpTM aRNA (Ambion). En effet, chaque hybridation nécessite une quantité relativement importante d'ARN, tandis que la quantité d'ARN disponible est parfois limitée. L'amplification MessageAmpTM est basée sur le protocole d'amplification d'ARN développé par Van Gelder *et coll.* (Van Gelder et al., 1990) et permet d'amplifier de façon homogène l'ensemble des ARNm à partir d'un pool d'ARN totaux.

En routine, 1 µg à 3 µg d'ARN totaux sont utilisés pour une quantité finale d'environ 20 à 100 µg, dans un volume de 100 µl. Les ARN aminoalyles antisens amplifiés (ARNa)

générés sont directement utilisables pour le protocole d'hybridation, à condition que les sondes déposées sur la puce soient des fragments d'ADN sens.

Les synthèses du premier puis deuxième brin d'ADNc ainsi que l'étape de transcription *in vitro* au cours de laquelle l'ADNc est amplifié et des groupes aminoalyles sont incorporés sont réalisées grâce au kit MessageAmpTM aRNA (Ambion, #1753). Les volumes de réactifs utilisés au cours de ces étapes ne seront pas détaillés puisque les concentrations de chaque produit utilisé ainsi que la composition des tampons ne sont pas communiquées par le fournisseur. Nous pouvons cependant préciser les quatre étapes aboutissant à l'amplification des ARN qui sont schématisées dans la Figure IV-3 :

- La première étape est la synthèse du premier brin d'ADNc par transcription reverse, réalisée en utilisant des amorces aléatoires de amorce T7Oligo (dT). Dans le cas d'un pool d'ARN totaux, seuls les ARNm polyA sont sélectionnés pour l'amplification par la présence de la queue polyT sur l'amorce ;
- La seconde étape permet la synthèse du deuxième brin d'ADNc par la DNA polymérase du phage T7 ; la dégradation de la matrice s'effectue en ajoutant de la RNase H. On obtient un pool d'ADNc en proportion 1:1 en comparaison des ARNm présents dans le pool de départ ;
- La troisième étape est constituée de la purification des ADNc sur filtres ; ainsi les enzymes, sels, ARN et amorces en excès sont éliminés
- Enfin, la dernière étape est celle de la transcription *in vitro*. Les ADNc sont utilisés comme matrice pour leur amplification linéaire en ARN antisens qui incorporent des groupes amino-alyles. Au cours de cette réaction, tous les nucléotides UTP incorporent des amino-alyles. Puis les aARN sont purifiés sur colonne afin d'enlever les enzymes, les nucléotides et les sels en excès.

Les aARNs ont été dosés grâce au NanoDrop 1000A Spectrophotometer puis 300 ng ont été déposés sur gel agarose 2% pour être vérifiés avant que la préparation soit couplée aux fluorochromes (Figure IV-6).

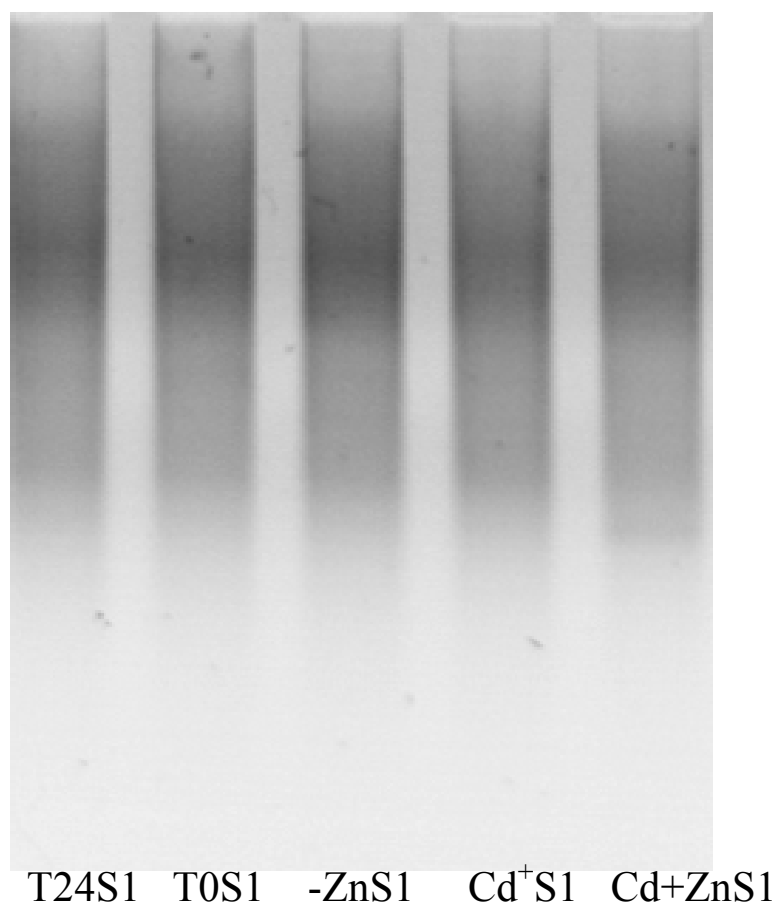


Figure IV-6 : Vérification de la qualité des ARN amplifiés par électrophorèse sur gel d'agarose

Préparation des fluorochromes³

Le NHS-ester monofonctionnel Cy3 ou Cy5 (*Mono-functional Cy3/Cy5 reactive pack*, Amersham PA25001 et PA23001) est resuspendu dans du DMSO.

Couplage des fluorochromes

Les nucléotides portent désormais un groupement amine réactif, l'amino-allyl dUTP (aa-UTP) incorporé lors de la transcription *in vitro*. Au cours de cette étape, les groupes sont couplés à des N-hydroxysuccinimidyl esters (NHS esters) de Cy3 ou de Cy5. La méthode permet d'éviter les biais d'incorporation dus aux spécificités de chaque fluorochrome. Les cibles

³ Toutes les étapes faisant intervenir les fluorochromes s'effectuent à l'abri de la lumière

marquées sont ensuite purifiées sur colonne pour éliminer l'excédent de colorants, qui risque d'augmenter le bruit de fond.

Les hybridations ont été réalisées en « flip-flop » ou « *dye swap* » :

Pour chaque échantillon, deux tubes contenant 5 µg d'aARN et 2 tubes correspondants contenant 5 µg d'aARN référence ont été lyophilisés en vérifiant l'évaporation toutes les 5-10 min. Les aARNs ont été dissous dans un tampon favorisant le couplage (0.1M de carbonate de sodium) puis 12% (ARN :fluorophore) de la quantité totale de fluorochromes Cy3 ou Cy5 dans du DMSO ont été ajoutés. Suite au mélange, les échantillons ont été incubés 30 min à température ambiante et à l'obscurité. 0.6 M d'hydroxylamine ont été ajoutés et les échantillons ont à nouveau été incubés 15 min à température ambiante, à l'obscurité. Les produits de la réaction sont ensuite séparés par filtration sur colonne (kit MessageAmp™ aRNA Ambion) pour ne garder que les aARN dont les fluorochromes ont été incorporés.

Evaluation de l'incorporation des fluorochromes

Afin d'évaluer l'incorporation des fluorochromes, les aARN ont été dosés à l'aide du spectrophotomètre Nanodrop. L'incorporation est mesurée par :

Incorporation de Cy3 (en molécules pour 1000 nucléotides) = (DO 550 / DO 260)* 60

Incorporation de Cy5 (en molécules pour 1000 nucléotides) = (DO 650 / DO 260)* 36

Une efficacité d'incorporation correcte est comprise entre 30 et 60 molécules de fluorochrome pour 1000 nucléotides.

Pour chaque hybridation (une lame), on utilise 2 µg d'ARN amplifiés (aARN) pour le point expérimental et 2 µg d'ARN de référence (amplifié selon le même protocole). Les hybridations croisées (*dye swap*) sont réalisées en même temps, deux hybridations sont donc nécessaires pour chaque point expérimental.

Fragmentation des ARN antisens marqués Cy3 ou Cy5

Cette étape est indispensable pour l'hybridation car les puces utilisées ont été empreintes avec des oligonucléotides. Cette étape permet la fragmentation des aARN afin d'obtenir des nucléotides entre 60 et 200 bases. Pour cela, le volume des échantillons a été réduit à moins de 9 µl par évaporation sous vide. Le volume a ensuite été ajusté à 9 µl avec de l'H₂O nuclease-free puis 1 µl de Fragmentation Reagent (réactif permettant de fragmenter les aARN en 60 à 200 nucléotides dont la composition n'est pas indiquée par le fournisseur) a été ajouté et les échantillons ont été incubés 15 min à 70°C.

A l'issue de cette étape, les tubes du référentiel marqués Cy3 ou Cy5 sont mélangés ainsi que ceux des expériences. Les ADNc sont ensuite répartis en quantités identiques.

250 µl de mix d'hybridation de composition finale 5X Denhardt, 5X SSC, 0,1% SDS, 0,5µg/µl Yeast tRNA, 0,5µg/µl PolyA RNA, 30% Formamide désionisée ont été ajoutés à chaque échantillon. Le Poly d(A) et tRNA contribuent à la spécificité des hybridations. L'échantillon contenant l'aARN-Cy3 du point expérimental a été mélangé avec l'aARN-Cy5 du référentiel ; et inversement, l'échantillon contenant l'aARN-Cy5 du point expérimental a été rassemblé avec l'aARN-Cy3 du référentiel. Les échantillons ont été chauffés 2 min à 90°C puis incubés 30 min à 37°C avant d'être centrifugés 2 min à 10 000 xg.

Echantillon expérimental {Cy3}	+	Référence RH {Cy5}	→	tube 1
Echantillon expérimental {Cy5}	+	Référence RH {Cy3}	→	tube 2

Préparation des lames pour l'hybridation

La cible d'ADNc est placée dans un tampon de force ionique élevée (ex. : SSC) afin de réduire les répulsions électrostatiques et faciliter l'appariement des brins complémentaires. Des détergents (ex. : SDS) et des agents bloquants permettant de réduire l'hybridation non spécifique sont ajoutés pour réduire le bruit de fond.

On garde les lames dans un dessiccateur jusqu'à leur préhybridation.

Les lames à préhybrider sont immergées dans un tampon composé de Tris ethanolamine et 0.1% SDS, à 50°C pendant 15 minutes. Puis cinq lavages successifs dans de l'eau ultra-pure sont réalisées. Les lames sont ensuite incubées en immersion totale dans la solution de 4X SSC, 0,1% SDS à 50°C pendant 15 min puis lavées comme précédemment. Les lames sont ensuite séchées par centrifugation à 1000 rpm pendant 3 minutes. Enfin, les lames sont incubées en immersion totale dans le tampon composé de 5X SSC, 0,1% SDS, 1% BSA pendant 1 heure à 42°C. Les lames sont ensuite lavées et séchées comme précédemment. Les lames peuvent alors être conservées dans le dessiccateur jusqu'à utilisation.

Hybridation

La lame est placée sur un système de porte-lame Agilent (ouestgenopuces.univ-rennes1.fr/materiels_en.php, Hybridization Chamber) puis chaque échantillon, soit 500 µl, est déposé sur une lame du côté contenant les oligonucléotides. La lame contenant les spots est recouverte d'une seconde lame et le tout est emprisonné dans le système porte-lame Agilent (ouestgenopuces.univ-rennes1.fr/materiels_en.php, Hybridization Oven). Il faut être extrêmement attentif aux bulles d'air. Les porte-lames sont ensuite enchâssés sur les

portoirs du four rotatoire (photo de droite) et disposés de façon à équilibrer le système autour de l'axe giratoire. Le four est réglé à 42°C et l'incubation dure la nuit.

Lavages après hybridation

On effectue des lavages successifs dans des solutions de stringence décroissante afin d'éliminer l'hybridation non spécifique d'ADNc sur les lames. A aucun moment les lames ne doivent séchées entre les bains successifs si ce n'est au moment de la centrifugation.

Une fois sorties du four d'hybridation, les lames spottées par les oligonucléotides sont placées sur un portoir métallique avant d'être très rapidement incubées pendant 2 min en immersion totale et sous agitation modérée dans le Wash buffer I (2X SSC, 0,1% SDS). Les lames ont été rapidement égouttées en tapotant le portoir métallique sur un papier absorbant puis le portoir métallique a été transféré dans un bac contenant du Wash buffer II (1X SSC) en totale immersion et sous agitation modérée pendant 2 min. Cette opération est répétée pour un lavage dans un troisième tampon (0.2X SSC). Enfin, les lames ont été immédiatement centrifugées à 800 xg pendant 7 min à température ambiante. Les lames peuvent alors être analysées.

4.2 Validation des gènes utilisés pour la RT-PCR quantitative

Synthèse du premier brin d'ADNc

A 4°C, sont ajoutés dans l'ordre, de l'eau sans RNase pour obtenir un volume final de 20 µl, 10 µl de first strand master mix (concentré 2×), 3 µl de primer oligo(dT) (0.1 µg/µl), 1 µl d'enzyme AffinityScript RT/ RNase Block (Transcriptase reverse Moloney Murine Leukemia Virus) et 2 µg ARN total. Le mélange est centrifugé et incubé à 25°C pendant 5 min avant d'être incubé à 42°C pendant 30 min afin de réaliser la synthèse de l'ADNc. Enfin, le mélange est incubé à 95°C pendant 5 min pour terminer la réaction de synthèse de l'ADNc.

RT PCR Quantitative

Les expériences de Real-time PCR pour chacun des transcrits, ont été réalisées avec l'appareil Stratagene Mx3005P comme il suit: le mélange de réaction est composé de 12.5 µl de Full Velocity SYBR Green QPCR Master Mix (incluant l'ADN polymérase d'archae, le SYBR Green I, MgCl₂, les nucléotides (dG, dA, dU, dT, dC) et 140 nM de amorces sens et antisens et 5µl d'ADNc en quantité variable, le tout est ajusté à 25 µl avec de l'eau sans RNase. La

séquence d'amplification est la suivante : un cycle de dénaturation à 95°C pendant 5 min puis quarante cycles à 95°C pendant 10s et 60°C pendant 30s.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Aarenstrup, L., Falch, A.M., Jakobsen, K.K., Neve, S., Henriksen, L.L., Tommerup, N., Leffers, H. and Kristiansen, K. (2002) Expression and post-translational modification of human 4-hydroxy-phenylpyruvate dioxygenase. *Cell Biol Int*, **26**, 615-625.
- Afzal, M., Matsugo, S., Sasai, M., Xu, B., Aoyama, K. and Takeuchi, T. (2003) Method to overcome photoreaction, a serious drawback to the use of dichlorofluorescein in evaluation of reactive oxygen species. *Biochem Biophys Res Commun*, **304**, 619-624.
- Akesson, A., Berglund, M., Schutz, A., Bjellerup, P., Bremme, K. and Vahter, M. (2002) Cadmium exposure in pregnancy and lactation in relation to iron status. *Am J Public Health*, **92**, 284-287.
- Allende, M.L., Amsterdam, A., Becker, T., Kawakami, K., Gaiano, N. and Hopkins, N. (1996) Insertional mutagenesis in zebrafish identifies two novel genes, pescadillo and dead eye, essential for embryonic development. *Genes Dev*, **10**, 3141-3155.
- Andrews, G.K. (2000) Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions. *Biochem Pharmacol*, **59**, 95-104.
- Andrews, G.K. (2001) Cellular zinc sensors: MTF-1 regulation of gene expression. *Biometals*, **14**, 223-237.
- Andrews, N.C. (1999) Disorders of iron metabolism. *N Engl J Med*, **341**, 1986-1995.
- Arnaudeau, S., Frieden, M., Nakamura, K., Castelbou, C., Michalak, M. and Demareux, N. (2002) Calreticulin differentially modulates calcium uptake and release in the endoplasmic reticulum and mitochondria. *J Biol Chem*, **277**, 46696-46705.
- Artigas, P. and Gadsby, D.C. (2006) Ouabain affinity determining residues lie close to the Na/K pump ion pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 12613-12618.
- Arystarkhova, E., Donnet, C., Asinovski, N.K. and Sweadner, K.J. (2002) Differential regulation of renal Na,K-ATPase by splice variants of the gamma subunit. *J Biol Chem*, **277**, 10162-10172.
- Arystarkhova, E., Donnet, C., Munoz-Matta, A., Specht, S.C. and Sweadner, K.J. (2007) Multiplicity of expression of FXYD proteins in mammalian cells: dynamic exchange of phospholemman and gamma-subunit in response to stress. *Am J Physiol Cell Physiol*, **292**, C1179-1191.
- Auf der Maur, A., Belser, T., Wang, Y., Gunes, C., Lichtlen, P., Georgiev, O. and Schaffner, W. (2000) Characterization of the mouse gene for the heavy metal-responsive transcription factor MTF-1. *Cell Stress Chaperones*, **5**, 196-206.
- Azriel-Tamir, H., Sharir, H., Schwartz, B. and Hershfinkel, M. (2004) Extracellular zinc triggers ERK-dependent activation of Na⁺/H⁺ exchange in colonocytes mediated by the zinc-sensing receptor. *J Biol Chem*, **279**, 51804-51816.

B

- Bagrodia, S., Derijard, B., Davis, R.J. and Cerione, R.A. (1995) Cdc42 and PAK-mediated signaling leads to Jun kinase and p38 mitogen-activated protein kinase activation. *J Biol Chem*, **270**, 27995-27998.
- Baker, T.K., VanVooren, H.B., Smith, W.C. and Carfagna, M.A. (2003) Involvement of calcium channels in the sexual dimorphism of cadmium-induced hepatotoxicity. *Toxicol Lett*, **137**, 185-192.

- Ballatori, N. (2002) Transport of toxic metals by molecular mimicry. *Environ Health Perspect*, **110 Suppl 5**, 689-694.
- Ballatori, N., Hammond, C.L., Cunningham, J.B., Krance, S.M. and Marchan, R. (2005) Molecular mechanisms of reduced glutathione transport: role of the MRP/CFTR/ABCC and OATP/SLC21A families of membrane proteins. *Toxicol Appl Pharmacol*, **204**, 238-255.
- Banci, L., Benedetto, M., Bertini, I., Del Conte, R., Piccioli, M. and Viezzoli, M.S. (1998) Solution structure of reduced monomeric Q133M2 copper, zinc superoxide dismutase (SOD). Why is SOD a dimeric enzyme? *Biochemistry*, **37**, 11780-11791.
- Bannon, D.I., Abounader, R., Lees, P.S. and Bressler, J.P. (2003) Effect of DMT1 knockdown on iron, cadmium, and lead uptake in Caco-2 cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, **284**, C44-50.
- Barbier, O., Jacquillet, G., Tauc, M., Cougnon, M. and Poujeol, P. (2005) Effect of heavy metals on, and handling by, the kidney. *Nephron Physiol*, **99**, p105-110.
- Barbier, O., Jacquillet, G., Tauc, M., Poujeol, P. and Cougnon, M. (2004) Acute study of interaction among cadmium, calcium, and zinc transport along the rat nephron in vivo. *Am J Physiol Renal Physiol*, **287**, F1067-1075.
- Barondeau, D.P., Kassmann, C.J., Bruns, C.K., Tainer, J.A. and Getzoff, E.D. (2004) Nickel superoxide dismutase structure and mechanism. *Biochemistry*, **43**, 8038-8047.
- Beard, J.L., Dawson, H. and Pinero, D.J. (1996) Iron metabolism: a comprehensive review. *Nutr Rev*, **54**, 295-317.
- Beattie, J.H., Owen, H.L., Wallace, S.M., Arthur, J.R., Kwun, I.S., Hawksworth, G.M. and Wallace, H.M. (2005) Metallothionein overexpression and resistance to toxic stress. *Toxicol Lett*, **157**, 69-78.
- Berg, J.M. and Shi, Y. (1996) The galvanization of biology: a growing appreciation for the roles of zinc. *Science*, **271**, 1081-1085.
- Bergendi, L., Benes, L., Durackova, Z. and Ferencik, M. (1999) Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sci*, **65**, 1865-1874.
- Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L.M., Harding, H.P. and Ron, D. (2000) Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol*, **2**, 326-332.
- Beyersmann, D. and Hechtenberg, S. (1997) Cadmium, gene regulation, and cellular signalling in mammalian cells. *Toxicol Appl Pharmacol*, **144**, 247-261.
- Biagioli, M., Pifferi, S., Ragghianti, M., Bucci, S., Rizzuto, R. and Pinton, P. (2007) Endoplasmic reticulum stress and alteration in calcium homeostasis are involved in cadmium-induced apoptosis. *Cell Calcium*.
- Bittel, D., Dalton, T., Samson, S.L., Gedamu, L. and Andrews, G.K. (1998) The DNA binding activity of metal response element-binding transcription factor-1 is activated in vivo and in vitro by zinc, but not by other transition metals. *J Biol Chem*, **273**, 7127-7133.
- Bolotina, V.M. and Csutora, P. (2005) CIF and other mysteries of the store-operated Ca²⁺-entry pathway. *Trends Biochem Sci*, **30**, 378-387.
- Bonham, R.T., Fine, M.R., Pollock, F.M. and Shelden, E.A. (2003) Hsp27, Hsp70, and metallothionein in MDCK and LLC-PK1 renal epithelial cells: effects of prolonged exposure to cadmium. *Toxicol Appl Pharmacol*, **191**, 63-73.
- Brazzolotto, X., Andriollo, M., Guiraud, P., Favier, A. and Moulis, J.M. (2003) Interactions between doxorubicin and the human iron regulatory system. *Biochim Biophys Acta*, **1593**, 209-218.
- Brazzolotto, X., Gaillard, J., Pantopoulos, K., Hentze, M.W. and Moulis, J.M. (1999) Human cytoplasmic aconitase (Iron regulatory protein 1) is converted into its [3Fe-4S] form by hydrogen peroxide in vitro but is not activated for iron-responsive element binding. *J Biol Chem*, **274**, 21625-21630.

- Bressler, J.P., Olivi, L., Cheong, J.H., Kim, Y. and Bannona, D. (2004) Divalent metal transporter 1 in lead and cadmium transport. *Ann N Y Acad Sci*, **1012**, 142-152.
- Bridges, C.C. and Zalups, R.K. (2005) Molecular and ionic mimicry and the transport of toxic metals. *Toxicol Appl Pharmacol*, **204**, 274-308.
- Broeks, A., Gerrard, B., Allikmets, R., Dean, M. and Plasterk, R.H. (1996) Homologues of the human multidrug resistance genes MRP and MDR contribute to heavy metal resistance in the soil nematode *Caenorhabditis elegans*. *Embo J*, **15**, 6132-6143.
- Brouwer, M., Hoexum-Brouwer, T. and Cashon, R.E. (1993) A putative glutathione-binding site in CdZn-metalllothionein identified by equilibrium binding and molecular-modelling studies. *Biochem J*, **294** (Pt 1), 219-225.

C

- Cairo, G. and Pietrangelo, A. (2000) Iron regulatory proteins in pathobiology. *Biochem J*, **352** Pt 2, 241-250.
- Callaghan, A. and Denny, N. (2002) Evidence for an interaction between p-glycoprotein and cadmium toxicity in cadmium-resistant and -susceptible strains of *Drosophila melanogaster*. *Ecotoxicol Environ Saf*, **52**, 211-213.
- Carmichael, J., DeGraff, W.G., Gazdar, A.F., Minna, J.D. and Mitchell, J.B. (1987) Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res*, **47**, 936-942.
- Carrigan, P.E., Riggs, D.L., Chinkers, M. and Smith, D.F. (2005) Functional comparison of human and *Drosophila* Hop reveals novel role in steroid receptor maturation. *J Biol Chem*, **280**, 8906-8911.
- Chang, W. and Shoback, D. (2004) Extracellular Ca²⁺-sensing receptors--an overview. *Cell Calcium*, **35**, 183-196.
- Chemin, J., Nargeot, J. and Lory, P. (2007) Chemical determinants involved in anandamide-induced inhibition of T-type calcium channels. *J Biol Chem*, **282**, 2314-2323.
- Chen, S. and Smith, D.F. (1998) Hop as an adaptor in the heat shock protein 70 (Hsp70) and hsp90 chaperone machinery. *J Biol Chem*, **273**, 35194-35200.
- Chen, Z., Gibson, T.B., Robinson, F., Silvestro, L., Pearson, G., Xu, B., Wright, A., Vanderbilt, C. and Cobb, M.H. (2001) MAP kinases. *Chem Rev*, **101**, 2449-2476.
- Chevillard, S., Ugolin, N., Vielh, P., Ory, K., Levalois, C., Elliott, D., Clayman, G.L. and El-Naggar, A.K. (2004) Gene expression profiling of differentiated thyroid neoplasms: diagnostic and clinical implications. *Clin Cancer Res*, **10**, 6586-6597.
- Chimienti, F., Jourdan, E., Favier, A. and Seve, M. (2001) Zinc resistance impairs sensitivity to oxidative stress in HeLa cells: protection through metallothioneins expression. *Free Radic Biol Med*, **31**, 1179-1190.
- Chin, K.V., Tanaka, S., Darlington, G., Pastan, I. and Gottesman, M.M. (1990) Heat shock and arsenite increase expression of the multidrug resistance (MDR1) gene in human renal carcinoma cells. *J Biol Chem*, **265**, 221-226.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, **162**, 156-159.
- Chuang, S.M., Wang, I.C. and Yang, J.L. (2000) Roles of JNK, p38 and ERK mitogen-activated protein kinases in the growth inhibition and apoptosis induced by cadmium. *Carcinogenesis*, **21**, 1423-1432.
- Chun, Y.S., Choi, E., Kim, G.T., Choi, H., Kim, C.H., Lee, M.J., Kim, M.S. and Park, J.W. (2000) Cadmium blocks hypoxia-inducible factor (HIF)-1-mediated response to hypoxia

- by stimulating the proteasome-dependent degradation of HIF-1 α . *Eur J Biochem*, **267**, 4198-4204.
- Cigliano, S., Remondelli, P., Minichiello, L., Mellone, M.C., Martire, G., Bonatti, S. and Leone, A. (1996) Analysis of metal-regulated metallothionein and heat shock gene expression in HeLa-derived cadmium-resistant cells. *Exp Cell Res*, **228**, 173-180.
- Cousins, R.J., Liuzzi, J.P. and Lichten, L.A. (2006a) Mammalian zinc transport, trafficking, and signals. *J Biol Chem*.
- Cousins, R.J., Liuzzi, J.P. and Lichten, L.A. (2006b) Mammalian zinc transport, trafficking, and signals. *J Biol Chem*, **281**, 24085-24089.
- Coutant, A., Lebeau, J., Bidon-Wagner, N., Levalois, C., Lectard, B. and Chevillard, S. (2006) Cadmium-induced apoptosis in lymphoblastoid cell line: involvement of caspase-dependent and -independent pathways. *Biochimie*, **88**, 1815-1822.
- Crichton, R.R., Wilmet, S., Legssyer, R. and Ward, R.J. (2002) Molecular and cellular mechanisms of iron homeostasis and toxicity in mammalian cells. *J Inorg Biochem*, **91**, 9-18.
- Croute, F., Beau, B., Murat, J.C., Vincent, C., Komatsu, H., Obata, F. and Soleilhavoup, J.P. (2005) Expression of stress-related genes in a cadmium-resistant A549 human cell line. *J Toxicol Environ Health A*, **68**, 703-718.
- Crowe, A. and Morgan, E.H. (1997) Effect of dietary cadmium on iron metabolism in growing rats. *Toxicol Appl Pharmacol*, **145**, 136-146.

D

- Dalton, T.P., He, L., Wang, B., Miller, M.L., Jin, L., Stringer, K.F., Chang, X., Baxter, C.S. and Nebert, D.W. (2005) Identification of mouse SLC39A8 as the transporter responsible for cadmium-induced toxicity in the testis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 3401-3406.
- David, J. (2001) Les protéines de stress. *INRA Prod. Anim.*, **14**, 29-40.
- Davis, R.J. (2000) Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell*, **103**, 239-252.
- Deckert, J. (2005) Cadmium toxicity in plants: is there any analogy to its carcinogenic effect in mammalian cells? *Biometals*, **18**, 475-481.
- DeRisi, J.L., Iyer, V.R. and Brown, P.O. (1997) Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science*, **278**, 680-686.
- Dijkstra, M., Havinga, R., Vonk, R.J. and Kuipers, F. (1996) Bile secretion of cadmium, silver, zinc and copper in the rat. Involvement of various transport systems. *Life Sci*, **59**, 1237-1246.
- Dittmar, K.D. and Pratt, W.B. (1997) Folding of the glucocorticoid receptor by the reconstituted Hsp90-based chaperone machinery. The initial hsp90.p60.hsp70-dependent step is sufficient for creating the steroid binding conformation. *J Biol Chem*, **272**, 13047-13054.

E

- Ebadi, M., Iversen, P.L., Hao, R., Cerutis, D.R., Rojas, P., Happe, H.K., Murrin, L.C. and Pfeiffer, R.F. (1995) Expression and regulation of brain metallothionein. *Neurochem Int*, **27**, 1-22.
- Eisenstein, R.S., Tuazon, P.T., Schalinske, K.L., Anderson, S.A. and Traugh, J.A. (1993) Iron-responsive element-binding protein. Phosphorylation by protein kinase C. *J Biol Chem*, **268**, 27363-27370.

- Elez, D., Dundjerski, J. and Matic, G. (2001) Cadmium affects the redox state of rat liver glucocorticoid receptor. *Cell Biol Toxicol*, **17**, 169-177.
- Elisma, F. and Jumarie, C. (2001) Evidence for cadmium uptake through Nramp2: metal speciation studies with Caco-2 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **285**, 662-668.
- Endo, F., Kitano, A., Uehara, I., Nagata, N., Matsuda, I., Shinka, T., Kuhara, T. and Matsumoto, I. (1983) Four-hydroxyphenylpyruvic acid oxidase deficiency with normal fumarylacetoacetase: a new variant form of hereditary hypertyrosinemia. *Pediatr Res*, **17**, 92-96.
- Erlitzki, R., Long, J.C. and Theil, E.C. (2002) Multiple, conserved iron-responsive elements in the 3'-untranslated region of transferrin receptor mRNA enhance binding of iron regulatory protein 2. *J Biol Chem*, **277**, 42579-42587.

F

- Fatur, T., Lah, T.T. and Filipic, M. (2003) Cadmium inhibits repair of UV-, methyl methanesulfonate- and N-methyl-N-nitrosourea-induced DNA damage in Chinese hamster ovary cells. *Mutat Res*, **529**, 109-116.
- Fedorova, M., van de Mortel, J., Matsumoto, P.A., Cho, J., Town, C.D., VandenBosch, K.A., Gantt, J.S. and Vance, C.P. (2002) Genome-wide identification of nodule-specific transcripts in the model legume *Medicago truncatula*. *Plant Physiol*, **130**, 519-537.
- Fenteany, G. and Schreiber, S.L. (1998) Lactacystin, proteasome function, and cell fate. *J Biol Chem*, **273**, 8545-8548.
- Fillebeen, C., Caltagirone, A., Martelli, A., Moulis, J.M. and Pantopoulos, K. (2005) IRP1 Ser-711 is a phosphorylation site, critical for regulation of RNA-binding and aconitase activities. *Biochem J*, **388**, 143-150.
- Fillebeen, C., Chahine, D., Caltagirone, A., Segal, P. and Pantopoulos, K. (2003) A phosphomimetic mutation at Ser-138 renders iron regulatory protein 1 sensitive to iron-dependent degradation. *Mol Cell Biol*, **23**, 6973-6981.
- Finkel, T. (1998) Oxygen radicals and signaling. *Curr Opin Cell Biol*, **10**, 248-253.
- Frederickson, C.J., Suh, S.W., Silva, D. and Thompson, R.B. (2000) Importance of zinc in the central nervous system: the zinc-containing neuron. *J Nutr*, **130**, 1471S-1483S.
- Fridovich, I. (1998) The trail to superoxide dismutase. *Protein Sci*, **7**, 2688-2690.
- Friedman, P.A. and Gesek, F.A. (1994) Cadmium uptake by kidney distal convoluted tubule cells. *Toxicol Appl Pharmacol*, **128**, 257-263.

G

- Galan, A., Garcia-Bermejo, M.L., Troyano, A., Vilaboa, N.E., de Blas, E., Kazanietz, M.G. and Aller, P. (2000) Stimulation of p38 mitogen-activated protein kinase is an early regulatory event for the cadmium-induced apoptosis in human promonocytic cells. *J Biol Chem*, **275**, 11418-11424.
- Garcia, I., Rodgers, M., Lenne, C., Rolland, A., Sailland, A. and Matringe, M. (1997) Subcellular localization and purification of a p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase from cultured carrot cells and characterization of the corresponding cDNA. *Biochem J*, **325** (Pt 3), 761-769.
- Garrido, C. (2002) Size matters: of the small HSP27 and its large oligomers. *Cell Death Differ*, **9**, 483-485.

- Gate, L., Paul, J., Ba, G.N., Tew, K.D. and Tapiero, H. (1999) Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. *Biomed Pharmacother*, **53**, 169-180.
- Gavazzo, P., Morelli, E. and Marchetti, C. (2005) Susceptibility of insulinoma cells to cadmium and modulation by L-type calcium channels. *Biometals*, **18**, 131-142.
- Geering, K. (2005) Function of FXYD proteins, regulators of Na, K-ATPase. *J Bioenerg Biomembr*, **37**, 387-392.
- Geering, K. (2006) FXYD proteins: new regulators of Na-K-ATPase. *Am J Physiol Renal Physiol*, **290**, F241-250.
- Gervais, A., Lane, L.K., Anner, B.M., Lindenmayer, G.E. and Schwartz, A. (1977) A possible molecular mechanism of the action of digitalis: ouabain action on calcium binding to sites associated with a purified sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase from kidney. *Circ Res*, **40**, 8-14.
- Giedroc, D.P., Chen, X. and Apuy, J.L. (2001) Metal response element (MRE)-binding transcription factor-1 (MTF-1): structure, function, and regulation. *Antioxid Redox Signal*, **3**, 577-596.
- Goh, K.C., Haque, S.J. and Williams, B.R. (1999) p38 MAP kinase is required for STAT1 serine phosphorylation and transcriptional activation induced by interferons. *Embo J*, **18**, 5601-5608.
- Gorg, A., Boguth, G., Obermaier, C. and Weiss, W. (1998) Two-dimensional electrophoresis of proteins in an immobilized pH 4-12 gradient. *Electrophoresis*, **19**, 1516-1519.
- Gottschalg, E., Moore, N.E., Ryan, A.K., Travis, L.C., Waller, R.C., Pratt, S., Atmaca, M., Kind, C.N. and Fry, J.R. (2006) Phenotypic anchoring of arsenic and cadmium toxicity in three hepatic-related cell systems reveals compound- and cell-specific selective up-regulation of stress protein expression: implications for fingerprint profiling of cytotoxicity. *Chem Biol Interact*, **161**, 251-261.
- Goyer, R.A. (1997) Toxic and essential metal interactions. *Annu Rev Nutr*, **17**, 37-50.
- Gunshin, H., Allerson, C.R., Polycarpou-Schwarz, M., Rofts, A., Rogers, J.T., Kishi, F., Hentze, M.W., Rouault, T.A., Andrews, N.C. and Hediger, M.A. (2001) Iron-dependent regulation of the divalent metal ion transporter. *FEBS Lett*, **509**, 309-316.
- Gunshin, H., Mackenzie, B., Berger, U.V., Gunshin, Y., Romero, M.F., Boron, W.F., Nussberger, S., Gollan, J.L. and Hediger, M.A. (1997) Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature*, **388**, 482-488.
- Guo, B., Brown, F.M., Phillips, J.D., Yu, Y. and Leibold, E.A. (1995a) Characterization and expression of iron regulatory protein 2 (IRP2). Presence of multiple IRP2 transcripts regulated by intracellular iron levels. *J Biol Chem*, **270**, 16529-16535.
- Guo, B., Phillips, J.D., Yu, Y. and Leibold, E.A. (1995b) Iron regulates the intracellular degradation of iron regulatory protein 2 by the proteasome. *J Biol Chem*, **270**, 21645-21651.

H

- Haile, D.J., Rouault, T.A., Tang, C.K., Chin, J., Harford, J.B. and Klausner, R.D. (1992) Reciprocal control of RNA-binding and aconitase activity in the regulation of the iron-responsive element binding protein: role of the iron-sulfur cluster. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 7536-7540.
- Hamada, T., Tanimoto, A., Arima, N., Ide, Y., Sasaguri, T., Shimajiri, S., Murata, Y., Wang, K.Y. and Sasaguri, Y. (1998) Pathological study of splenomegaly associated with cadmium-induced anemia in rats. *J Uoeh*, **20**, 11-19.

- Hanas, J.S. and Gunn, C.G. (1996) Inhibition of transcription factor IIIA-DNA interactions by xenobiotic metal ions. *Nucleic Acids Res*, **24**, 924-930.
- Hansen, J.M., Zhang, H. and Jones, D.P. (2006) Differential oxidation of thioredoxin-1, thioredoxin-2, and glutathione by metal ions. *Free Radic Biol Med*, **40**, 138-145.
- Hart, B.A., Lee, C.H., Shukla, G.S., Shukla, A., Osier, M., Eneman, J.D. and Chiu, J.F. (1999) Characterization of cadmium-induced apoptosis in rat lung epithelial cells: evidence for the participation of oxidant stress. *Toxicology*, **133**, 43-58.
- Hart, B.A., Potts, R.J. and Watkin, R.D. (2001) Cadmium adaptation in the lung - a double-edged sword? *Toxicology*, **160**, 65-70.
- Hasumi, M., Suzuki, K., Matsui, H., Koike, H., Ito, K. and Yamanaka, H. (2003) Regulation of metallothionein and zinc transporter expression in human prostate cancer cells and tissues. *Cancer Lett*, **200**, 187-195.
- Hatcher, E.L., Chen, Y. and Kang, Y.J. (1995) Cadmium resistance in A549 cells correlates with elevated glutathione content but not antioxidant enzymatic activities. *Free Radic Biol Med*, **19**, 805-812.
- Haugland, R.P. (1994) Spectra of fluorescent dyes used in flow cytometry. *Methods Cell Biol*, **42 Pt B**, 641-663.
- Hawkins, C.L. and Davies, M.J. (2001) Generation and propagation of radical reactions on proteins. *Biochim Biophys Acta*, **1504**, 196-219.
- Hays, E.F. and Margaretten, N. (1985) Long-term oral cadmium produces bone marrow hypoplasia in mice. *Exp Hematol*, **13**, 229-234.
- He, L., Girijashanker, K., Dalton, T.P., Reed, J., Li, H., Soleimani, M. and Nebert, D.W. (2006) ZIP8, member of the solute-carrier-39 (SLC39) metal-transporter family: characterization of transporter properties. *Mol Pharmacol*, **70**, 171-180.
- Hebert, D.N., Foellmer, B. and Helenius, A. (1995) Glucose trimming and reglucosylation determine glycoprotein association with calnexin in the endoplasmic reticulum. *Cell*, **81**, 425-433.
- Heine, H., Delude, R.L., Monks, B.G., Espevik, T. and Golenbock, D.T. (1999) Bacterial lipopolysaccharide induces expression of the stress response genes hop and H411. *J Biol Chem*, **274**, 21049-21055.
- Helbock, H.J., Beckman, K.B., Shigenaga, M.K., Walter, P.B., Woodall, A.A., Yeo, H.C. and Ames, B.N. (1998) DNA oxidation matters: the HPLC-electrochemical detection assay of 8-oxo-deoxyguanosine and 8-oxo-guanine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 288-293.
- Hentze, M.W., Caughman, S.W., Rouault, T.A., Barriocanal, J.G., Dancis, A., Harford, J.B. and Klausner, R.D. (1987) Identification of the iron-responsive element for the translational regulation of human ferritin mRNA. *Science*, **238**, 1570-1573.
- Hentze, M.W., Muckenthaler, M.U. and Andrews, N.C. (2004) Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell*, **117**, 285-297.
- Herrmann, J., Lerman, L.O. and Lerman, A. (2007) Ubiquitin and ubiquitin-like proteins in protein regulation. *Circ Res*, **100**, 1276-1291.
- Himeno, S., Yanagiya, T., Enomoto, S., Kondo, Y. and Imura, N. (2002) Cellular cadmium uptake mediated by the transport system for manganese. *Tohoku J Exp Med*, **196**, 43-50.
- Hinkle, P.M., Kinsella, P.A. and Osterhoudt, K.C. (1987) Cadmium uptake and toxicity via voltage-sensitive calcium channels. *J Biol Chem*, **262**, 16333-16337.
- Hinkle, P.M., Shanshala, E.D., 2nd and Nelson, E.J. (1992) Measurement of intracellular cadmium with fluorescent dyes. Further evidence for the role of calcium channels in cadmium uptake. *J Biol Chem*, **267**, 25553-25559.
- Hino, M., Kurogi, K., Okubo, M.A., Murata-Hori, M. and Hosoya, H. (2000) Small heat shock protein 27 (HSP27) associates with tubulin/microtubules in HeLa cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **271**, 164-169.

- Hiramatsu, N., Kasai, A., Du, S., Takeda, M., Hayakawa, K., Okamura, M., Yao, J. and Kitamura, M. (2007) Rapid, transient induction of ER stress in the liver and kidney after acute exposure to heavy metal: evidence from transgenic sensor mice. *FEBS Lett*, **581**, 2055-2059.
- Hirano, S., Sun, X., DeGuzman, C.A., Ransom, R.F., McLeish, K.R., Smoyer, W.E., Shelden, E.A., Welsh, M.J. and Benndorf, R. (2005) p38 MAPK/HSP25 signaling mediates cadmium-induced contraction of mesangial cells and renal glomeruli. *Am J Physiol Renal Physiol*, **288**, F1133-1143.
- Hirano, T., Yamaguchi, Y. and Kasai, H. (1997) Inhibition of 8-hydroxyguanine repair in testes after administration of cadmium chloride to GSH-depleted rats. *Toxicol Appl Pharmacol*, **147**, 9-14.
- Holmgren, A., Johansson, C., Berndt, C., Lonn, M.E., Hudemann, C. and Lillig, C.H. (2005) Thiol redox control via thioredoxin and glutaredoxin systems. *Biochem Soc Trans*, **33**, 1375-1377.
- Horiguchi, H., Kayama, F., Oguma, E., Willmore, W.G., Hradecky, P. and Bunn, H.F. (2000) Cadmium and platinum suppression of erythropoietin production in cell culture: clinical implications. *Blood*, **96**, 3743-3747.
- Horiguchi, H., Sato, M., Konno, N. and Fukushima, M. (1996) Long-term cadmium exposure induces anemia in rats through hypoinduction of erythropoietin in the kidneys. *Arch Toxicol*, **71**, 11-19.
- Horiguchi, H., Teranishi, H., Niiya, K., Aoshima, K., Katoh, T., Sakuragawa, N. and Kasuya, M. (1994) Hypoproduction of erythropoietin contributes to anemia in chronic cadmium intoxication: clinical study on Itai-itai disease in Japan. *Arch Toxicol*, **68**, 632-636.
- Hsieh, C.C. and Papaconstantinou, J. (2006) Thioredoxin-ASK1 complex levels regulate ROS-mediated p38 MAPK pathway activity in livers of aged and long-lived Snell dwarf mice. *Faseb J*, **20**, 259-268.
- Huang, M., Krepkiy, D., Hu, W. and Petering, D.H. (2004) Zn-, Cd-, and Pb-transcription factor IIIA: properties, DNA binding, and comparison with TFIIIA-finger 3 metal complexes. *J Inorg Biochem*, **98**, 775-785.
- Hubert, N. and Hentze, M.W. (2002) Previously uncharacterized isoforms of divalent metal transporter (DMT)-1: implications for regulation and cellular function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 12345-12350.
- Hung, J.J., Cheng, T.J., Lai, Y.K. and Chang, M.D. (1998) Differential activation of p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated protein kinases confers cadmium-induced HSP70 expression in 9L rat brain tumor cells. *J Biol Chem*, **273**, 31924-31931.
- Hurley, J.H., Lee, S. and Prag, G. (2006) Ubiquitin-binding domains. *Biochem J*, **399**, 361-372.
- Huynh-Delerme, C., Huet, H., Noel, L., Frigieri, A. and Kolf-Clauw, M. (2005) Increased functional expression of P-glycoprotein in Caco-2 TC7 cells exposed long-term to cadmium. *Toxicol In Vitro*, **19**, 439-447.

I

- Inesi, G., Hua, S., Xu, C., Ma, H., Seth, M., Prasad, A.M. and Sumbilla, C. (2005) Studies of Ca²⁺ ATPase (SERCA) inhibition. *J Bioenerg Biomembr*, **37**, 365-368.
- Innamorati, G., Piccirillo, R., Bagnato, P., Palmisano, I. and Schiaffino, M.V. (2006) The melanosomal/lysosomal protein OA1 has properties of a G protein-coupled receptor. *Pigment Cell Res*, **19**, 125-135.

- Ip, Y.T. and Davis, R.J. (1998) Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)--from inflammation to development. *Curr Opin Cell Biol*, **10**, 205-219.
- Iryo, Y., Matsuoka, M., Wispriyono, B., Sugiura, T. and Igisu, H. (2000) Involvement of the extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) pathway in the induction of apoptosis by cadmium chloride in CCRF-CEM cells. *Biochem Pharmacol*, **60**, 1875-1882.
- Iwai, K., Drake, S.K., Wehr, N.B., Weissman, A.M., LaVaute, T., Minato, N., Klausner, R.D., Levine, R.L. and Rouault, T.A. (1998) Iron-dependent oxidation, ubiquitination, and degradation of iron regulatory protein 2: implications for degradation of oxidized proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 4924-4928.
- Iwawaki, T., Akai, R., Kohno, K. and Miura, M. (2004) A transgenic mouse model for monitoring endoplasmic reticulum stress. *Nat Med*, **10**, 98-102.

J

- Jacquillet, G., Barbier, O., Cougnon, M., Tauc, M., Namorado, M.C., Martin, D., Reyes, J.L. and Poujeol, P. (2006) Zinc protects renal function during cadmium intoxication in the rat. *Am J Physiol Renal Physiol*, **290**, F127-137.
- Jarup, L. (2002) Cadmium overload and toxicity. *Nephrol Dial Transplant*, **17 Suppl 2**, 35-39.
- Jeon, H.K., Jin, H.S., Lee, D.H., Choi, W.S., Moon, C.K., Oh, Y.J. and Lee, T.H. (2004) Proteome analysis associated with cadmium adaptation in U937 cells: identification of calbindin-D28k as a secondary cadmium-responsive protein that confers resistance to cadmium-induced apoptosis. *J Biol Chem*, **279**, 31575-31583.
- Johnson, M.D., Kenney, N., Stoica, A., Hilakivi-Clarke, L., Singh, B., Chepko, G., Clarke, R., Sholler, P.F., Lirio, A.A., Foss, C., Reiter, R., Trock, B., Paik, S. and Martin, M.B. (2003) Cadmium mimics the in vivo effects of estrogen in the uterus and mammary gland. *Nat Med*, **9**, 1081-1084.
- Jungmann, J., Reins, H.A., Schobert, C. and Jentsch, S. (1993) Resistance to cadmium mediated by ubiquitin-dependent proteolysis. *Nature*, **361**, 369-371.
- Jurczuk, M., Brzoska, M.M., Rogalska, J. and Moniuszko-Jakoniuk, J. (2003) Iron body status of rats chronically exposed to cadmium and ethanol. *Alcohol Alcohol*, **38**, 202-207.

K

- Kanthasamy, A.G., Isom, G.E. and Borowitz, J.L. (1995) Role of intracellular Cd²⁺ in catecholamine release and lethality in PC12 cells. *Toxicol Lett*, **81**, 151-157.
- Karlseder, J., Rotheneder, H. and Wintersberger, E. (1996) Interaction of Sp1 with the growth- and cell cycle-regulated transcription factor E2F. *Mol Cell Biol*, **16**, 1659-1667.
- Kato, K., Hasegawa, K., Goto, S. and Inaguma, Y. (1994) Dissociation as a result of phosphorylation of an aggregated form of the small stress protein, hsp27. *J Biol Chem*, **269**, 11274-11278.
- Kavana, M. and Moran, G.R. (2003) Interaction of (4-hydroxyphenyl)pyruvate dioxygenase with the specific inhibitor 2-[2-nitro-4-(trifluoromethyl)benzoyl]-1,3-cyclohexanedione. *Biochemistry*, **42**, 10238-10245.
- Kaynar, H., Meral, M., Turhan, H., Keles, M., Celik, G. and Akcay, F. (2005) Glutathione peroxidase, glutathione-S-transferase, catalase, xanthine oxidase, Cu-Zn superoxide dismutase activities, total glutathione, nitric oxide, and malondialdehyde levels in erythrocytes of patients with small cell and non-small cell lung cancer. *Cancer Lett*, **227**, 133-139.

- Kazantzis, G. (2004) Cadmium, osteoporosis and calcium metabolism. *Biometals*, **17**, 493-498.
- Khrapko, K.R., Lysov Yu, P., Khorlyn, A.A., Shick, V.V., Florentiev, V.L. and Mirzabekov, A.D. (1989) An oligonucleotide hybridization approach to DNA sequencing. *FEBS Lett*, **256**, 118-122.
- Kim, D.W., Kim, K.Y., Choi, B.S., Youn, P., Ryu, D.Y., Klaassen, C.D. and Park, J.D. (2006) Regulation of metal transporters by dietary iron, and the relationship between body iron levels and cadmium uptake. *Arch Toxicol*.
- Kim, J. and Sharma, R.P. (2004) Calcium-mediated activation of c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) and apoptosis in response to cadmium in murine macrophages. *Toxicol Sci*, **81**, 518-527.
- Kim, S.D., Moon, C.K., Eun, S.Y., Ryu, P.D. and Jo, S.A. (2005) Identification of ASK1, MKK4, JNK, c-Jun, and caspase-3 as a signaling cascade involved in cadmium-induced neuronal cell apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*, **328**, 326-334.
- Kimmins, S. and MacRae, T.H. (2000) Maturation of steroid receptors: an example of functional cooperation among molecular chaperones and their associated proteins. *Cell Stress Chaperones*, **5**, 76-86.
- Kinne-Saffran, E., Hulseweh, M., Pfaff, C. and Kinne, R.K. (1993) Inhibition of Na,K-ATPase by cadmium: different mechanisms in different species. *Toxicol Appl Pharmacol*, **121**, 22-29.
- Klaassen, C.D., Liu, J. and Choudhuri, S. (1999) Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **39**, 267-294.
- Kleizen, B. and Braakman, I. (2004) Protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum. *Curr Opin Cell Biol*, **16**, 343-349.
- Koizumi, S., Suzuki, K., Ogra, Y., Yamada, H. and Otsuka, F. (1999) Transcriptional activity and regulatory protein binding of metal-responsive elements of the human metallothionein-IIA gene. *Eur J Biochem*, **259**, 635-642.
- Kokkinou, D., Kasper, H.U., Bartz-Schmidt, K.U. and Schraermeyer, U. (2004) The pigmentation of human iris influences the uptake and storing of zinc. *Pigment Cell Res*, **17**, 515-518.
- Kosano, H., Stensgard, B., Charlesworth, M.C., McMahon, N. and Toft, D. (1998) The assembly of progesterone receptor-hsp90 complexes using purified proteins. *J Biol Chem*, **273**, 32973-32979.
- Kostic, M.M., Ognjanovic, B., Dimitrijevic, S., Zikic, R.V., Stajn, A., Rosic, G.L. and Zivkovic, R.V. (1993) Cadmium-induced changes of antioxidant and metabolic status in red blood cells of rats: in Cadmium-induced changes of antioxidant and metabolic status in red blood cells of rats: in vivo effects. *Eur J Haematol*, **51**, 86-92.
- Kunzelmann, K. and Mall, M. (2002) Electrolyte transport in the mammalian colon: mechanisms and implications for disease. *Physiol Rev*, **82**, 245-289.

L

- Lag, M., Refsnes, M., Lilleaas, E.M., Holme, J.A., Becher, R. and Schwarze, P.E. (2005) Role of mitogen activated protein kinases and protein kinase C in cadmium-induced apoptosis of primary epithelial lung cells. *Toxicology*, **211**, 253-264.
- Langmade, S.J., Ravindra, R., Daniels, P.J. and Andrews, G.K. (2000) The transcription factor MTF-1 mediates metal regulation of the mouse ZnT1 gene. *J Biol Chem*, **275**, 34803-34809.

- Lau, A.T., Zhang, J. and Chiu, J.F. (2006) Acquired tolerance in cadmium-adapted lung epithelial cells: roles of the c-Jun N-terminal kinase signaling pathway and basal level of metallothionein. *Toxicol Appl Pharmacol*, **215**, 1-8.
- Leal, R.B., Posser, T., Rigon, A.P., Oliveira, C.S., Goncalves, C.A., Gelain, D.P. and Dunkley, P.R. (2007) Cadmium stimulates MAPKs and Hsp27 phosphorylation in bovine adrenal chromaffin cells. *Toxicology*, **234**, 34-43.
- Lee, D.H. and Goldberg, A.L. (1998) Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. *Trends Cell Biol*, **8**, 397-403.
- Lee, M.J., Nishio, H., Ayaki, H., Yamamoto, M. and Sumino, K. (2002) Upregulation of stress response mRNAs in COS-7 cells exposed to cadmium. *Toxicology*, **174**, 109-117.
- Leslie, E.M., Deeley, R.G. and Cole, S.P. (2005) Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicol Appl Pharmacol*, **204**, 216-237.
- Leslie, E.M., Liu, J., Klaassen, C.D. and Waalkes, M.P. (2006) Acquired cadmium resistance in metallothionein-I/II(-/-) knockout cells: role of the T-type calcium channel Cacnalpha1G in cadmium uptake. *Mol Pharmacol*, **69**, 629-639.
- Liang, P. and MacRae, T.H. (1997) Molecular chaperones and the cytoskeleton. *J Cell Sci*, **110** (Pt 13), 1431-1440.
- Lichtlen, P. and Schaffner, W. (2001) Putting its fingers on stressful situations: the heavy metal-regulatory transcription factor MTF-1. *Bioessays*, **23**, 1010-1017.
- Lichtlen, P., Wang, Y., Belser, T., Georgiev, O., Certa, U., Sack, R. and Schaffner, W. (2001) Target gene search for the metal-responsive transcription factor MTF-1. *Nucleic Acids Res*, **29**, 1514-1523.
- Lindberg, S., Landberg, T. and Greger, M. (2004) A new method to detect cadmium uptake in protoplasts. *Planta*, **219**, 526-532.
- Lindstedt, S., Holme, E., Lock, E.A., Hjalmarson, O. and Strandvik, B. (1992) Treatment of hereditary tyrosinaemia type I by inhibition of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *Lancet*, **340**, 813-817.
- Liu, F., Inageda, K., Nishitai, G. and Matsuoka, M. (2006) Cadmium induces the expression of Grp78, an endoplasmic reticulum molecular chaperone, in LLC-PK1 renal epithelial cells. *Environ Health Perspect*, **114**, 859-864.
- Liu, F. and Jan, K.Y. (2000) DNA damage in arsenite- and cadmium-treated bovine aortic endothelial cells. *Free Radic Biol Med*, **28**, 55-63.
- Loumbourdis, N.S. and Vogiatzis, A.K. (2002) Impact of cadmium on liver pigmentary system of the frog *Rana ridibunda*. *Ecotoxicol Environ Saf*, **53**, 52-58.

M

- Maeshima, H., Sato, M., Ishikawa, K., Katagata, Y. and Yoshida, T. (1996) Participation of altered upstream stimulatory factor in the induction of rat heme oxygenase-1 by cadmium. *Nucleic Acids Res*, **24**, 2959-2965.
- Maitani, T. and Suzuki, K.T. (1982) Changes of essential metal levels in selected tissues and splenomegaly induced by the injection of suspending cadmium salt into mice. *Toxicol Appl Pharmacol*, **62**, 219-227.
- Malli, R., Frieden, M., Osibow, K., Zoratti, C., Mayer, M., Demarex, N. and Graier, W.F. (2003) Sustained Ca²⁺ transfer across mitochondria is Essential for mitochondrial Ca²⁺ buffering, store-operated Ca²⁺ entry, and Ca²⁺ store refilling. *J Biol Chem*, **278**, 44769-44779.

- Martelli, A. and Moulis, J.M. (2004) Zinc and cadmium specifically interfere with RNA-binding activity of human iron regulatory protein 1. *J Inorg Biochem*, **98**, 1413-1420.
- Martelli, A., Rousselet, E., Dycke, C., Bouron, A. and Moulis, J.M. (2006) Cadmium toxicity in animal cells by interference with essential metals. *Biochimie*, **88**, 1807-1814.
- Martelli, A., Salin, B., Dycke, C., Louwagie, M., Andrieu, J.P., Richaud, P. and Moulis, J.M. (2007) Folding and turnover of human iron regulatory protein 1 depend on its subcellular localization. *Febs J*, **274**, 1083-1092.
- Martelli, A.M., JM. (2004) Zinc and cadmium specially interfere with RNA-binding activity of human Iron Regulatory Protein 1. *J. Inorg. Biochem.*
- Martin, P., Fareh, M., Poggi, M.C., Boulukos, K.E. and Pognonec, P. (2006a) Manganese is highly effective in protecting cells from cadmium intoxication. *Biochem Biophys Res Commun*, **351**, 294-299.
- Martin, P., Poggi, M.C., Chambard, J.C., Boulukos, K.E. and Pognonec, P. (2006b) Low dose cadmium poisoning results in sustained ERK phosphorylation and caspase activation. *Biochem Biophys Res Commun*, **350**, 803-807.
- Matsuoka, M. and Igisu, H. (1998) Activation of c-Jun NH2-terminal kinase (JNK/SAPK) in LLC-PK1 cells by cadmium. *Biochem Biophys Res Commun*, **251**, 527-532.
- Meister, A. (1994) Glutathione, ascorbate, and cellular protection. *Cancer Res*, **54**, 1969s-1975s.
- Meusser, B., Hirsch, C., Jarosch, E. and Sommer, T. (2005) ERAD: the long road to destruction. *Nat Cell Biol*, **7**, 766-772.
- Meyron-Holtz, E.G., Ghosh, M.C. and Rouault, T.A. (2004) Mammalian tissue oxygen levels modulate iron-regulatory protein activities in vivo. *Science*, **306**, 2087-2090.
- Min, K.S., Kim, H., Fujii, M., Tetsuchikawahara, N. and Onosaka, S. (2002) Glucocorticoids suppress the inflammation-mediated tolerance to acute toxicity of cadmium in mice. *Toxicol Appl Pharmacol*, **178**, 1-7.
- Mori, K. (2000) Tripartite management of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell*, **101**, 451-454.
- Morimoto, R.I. (1998) Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev*, **12**, 3788-3796.
- Mouron, S.A., Golijow, C.D. and Dulout, F.N. (2001) DNA damage by cadmium and arsenic salts assessed by the single cell gel electrophoresis assay. *Mutat Res*, **498**, 47-55.
- Muckenthaler, M., Gray, N.K. and Hentze, M.W. (1998) IRP-1 binding to ferritin mRNA prevents the recruitment of the small ribosomal subunit by the cap-binding complex eIF4F. *Mol Cell*, **2**, 383-388.
- Mueller, S. (2005) Iron regulatory protein 1 as a sensor of reactive oxygen species. *Biofactors*, **24**, 171-181.

N

- Nakai, C., Nozaki, M. and Hayaishi, O. (1975) Studies on a possible reaction intermediate of p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *Biochem Biophys Res Commun*, **67**, 590-595.
- Nakanishi, K., Kamiguchi, K., Torigoe, T., Nabeta, C., Hirohashi, Y., Asanuma, H., Tobioka, H., Koge, N., Harada, O., Tamura, Y., Nagano, H., Yano, S., Chiba, S., Matsumoto, H. and Sato, N. (2004) Localization and function in endoplasmic reticulum stress tolerance of ERdj3, a new member of Hsp40 family protein. *Cell Stress Chaperones*, **9**, 253-264.
- Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D. and Ehrhardt, W. (1988) Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at

- nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis*, **9**, 255-262.
- Neuschwander-Tetri, B.A. and Roll, F.J. (1989) Glutathione measurement by high-performance liquid chromatography separation and fluorometric detection of the glutathione-orthophthalaldehyde adduct. *Anal Biochem*, **179**, 236-241.
- Neve, S., Aarenstrup, L., Tornehave, D., Rahbek-Nielsen, H., Corydon, T.J., Roepstorff, P. and Kristiansen, K. (2003) Tissue distribution, intracellular localization and proteolytic processing of rat 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *Cell Biol Int*, **27**, 611-624.
- Nguyen, C., Rocha, D., Granjeaud, S., Baldit, M., Bernard, K., Naquet, P. and Jordan, B.R. (1995) Differential gene expression in the murine thymus assayed by quantitative hybridization of arrayed cDNA clones. *Genomics*, **29**, 207-216.
- Nicolaus, B.J. (2005) A critical review of the function of neuromelanin and an attempt to provide a unified theory. *Med Hypotheses*, **65**, 791-796.
- Nishi, T. and Forgac, M. (2002) The vacuolar (H⁺)-ATPases--nature's most versatile proton pumps. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3**, 94-103.
- Nishimoto, M., Sakaue, M. and Hara, S. (2006) Short-interfering RNA-mediated silencing of thioredoxin reductase 1 alters the sensitivity of HeLa cells toward cadmium. *Biol Pharm Bull*, **29**, 543-546.
- Nishimura, Y., Yamaguchi, J.Y., Kanada, A., Horimoto, K., Kanemaru, K., Satoh, M. and Oyama, Y. (2006) Increase in intracellular Cd(2+) concentration of rat cerebellar granule neurons incubated with cadmium chloride: cadmium cytotoxicity under external Ca(2+)-free condition. *Toxicol In Vitro*, **20**, 211-216.

O

- Obara, N., Imagawa, S., Nakano, Y., Suzuki, N., Yamamoto, M. and Nagasawa, T. (2003) Suppression of erythropoietin gene expression by cadmium depends on inhibition of HIF-1, not stimulation of GATA-2. *Arch Toxicol*, **77**, 267-273.
- O'Brien, P. and Salacinski, H.J. (1998) Evidence that the reactions of cadmium in the presence of metallothionein can produce hydroxyl radicals. *Arch Toxicol*, **72**, 690-700.
- Ohana, E., Sekler, I., Kaisman, T., Kahn, N., Cove, J., Silverman, W.F., Amsterdam, A. and Hershfinkel, M. (2006) Silencing of ZnT-1 expression enhances heavy metal influx and toxicity. *J Mol Med*, **84**, 753-763.
- Ohgami, R.S., Campagna, D.R., Greer, E.L., Antiochos, B., McDonald, A., Chen, J., Sharp, J.J., Fujiwara, Y., Barker, J.E. and Fleming, M.D. (2005) Identification of a ferrireductase required for efficient transferrin-dependent iron uptake in erythroid cells. *Nat Genet*, **37**, 1264-1269.
- Olivi, L., Sisk, J. and Bressler, J. (2001) Involvement of DMT1 in uptake of Cd in MDCK cells: role of protein kinase C. *Am J Physiol Cell Physiol*, **281**, C793-800.
- Ono, K. and Han, J. (2000) The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell Signal*, **12**, 1-13.
- Othumpangat, S., Kashon, M. and Joseph, P. (2005) Eukaryotic translation initiation factor 4E is a cellular target for toxicity and death due to exposure to cadmium chloride. *J Biol Chem*, **280**, 25162-25169.
- Otsuka, F. (2001) Molecular mechanism of the metallothionein gene expression mediated by metal responsive transcription factor 1. *J health Science*, **47**, 513-519.

P

- Palmiter, R.D. (2004) Protection against zinc toxicity by metallothionein and zinc transporter 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 4918-4923.
- Palmiter, R.D. and Findley, S.D. (1995) Cloning and functional characterization of a mammalian zinc transporter that confers resistance to zinc. *Embo J*, **14**, 639-649.
- Pantopoulos, K. (2004) Iron metabolism and the IRE/IRP regulatory system: an update. *Ann N Y Acad Sci*, **1012**, 1-13.
- Pantopoulos, K. and Hentze, M.W. (1995) Nitric oxide signaling to iron-regulatory protein: direct control of ferritin mRNA translation and transferrin receptor mRNA stability in transfected fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 1267-1271.
- Parcellier, A., Schmitt, E., Gurbuxani, S., Seigneurin-Berny, D., Pance, A., Chantome, A., Plenchette, S., Khochbin, S., Solary, E. and Garrido, C. (2003) HSP27 is a ubiquitin-binding protein involved in I-kappaBalpha proteasomal degradation. *Mol Cell Biol*, **23**, 5790-5802.
- Pathak, N. and Khandelwal, S. (2006a) Influence of cadmium on murine thymocytes: potentiation of apoptosis and oxidative stress. *Toxicol Lett*, **165**, 121-132.
- Pathak, N. and Khandelwal, S. (2006b) Oxidative stress and apoptotic changes in murine splenocytes exposed to cadmium. *Toxicology*, **220**, 26-36.
- Pathak, N. and Khandelwal, S. (2007) Role of oxidative stress and apoptosis in cadmium induced thymic atrophy and splenomegaly in mice. *Toxicol Lett*, **169**, 95-108.
- Paulusma, C.C., Kool, M., Bosma, P.J., Scheffer, G.L., ter Borg, F., Scheper, R.J., Tytgat, G.N., Borst, P., Baas, F. and Oude Elferink, R.P. (1997) A mutation in the human canalicular multispecific organic anion transporter gene causes the Dubin-Johnson syndrome. *Hepatology*, **25**, 1539-1542.
- Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B.E., Karandikar, M., Berman, K. and Cobb, M.H. (2001) Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev*, **22**, 153-183.
- Peppiatt, C.M., Holmes, A.M., Seo, J.T., Bootman, M.D., Collins, T.J., McDonald, F. and Roderick, H.L. (2004) Calmidazolium and arachidonate activate a calcium entry pathway that is distinct from store-operated calcium influx in HeLa cells. *Biochem J*, **381**, 929-939.
- Piasek, M., Blanusa, M., Kostial, K. and Laskey, J.W. (2004) Low iron diet and parenteral cadmium exposure in pregnant rats: the effects on trace elements and fetal viability. *Biometals*, **17**, 1-14.
- Pietu, G., Alibert, O., Guichard, V., Lamy, B., Bois, F., Leroy, E., Mariage-Sampson, R., Houlgatte, R., Soularue, P. and Auffray, C. (1996) Novel gene transcripts preferentially expressed in human muscles revealed by quantitative hybridization of a high density cDNA array. *Genome Res*, **6**, 492-503.
- Pines, J. and Lindon, C. (2005) Proteolysis: anytime, any place, anywhere? *Nat Cell Biol*, **7**, 731-735.
- Pinton, P. and Rizzuto, R. (2006) Bcl-2 and Ca²⁺ homeostasis in the endoplasmic reticulum. *Cell Death Differ*, **13**, 1409-1418.
- Plonka, P.M. and Grabacka, M. (2006) Melanin synthesis in microorganisms--biotechnological and medical aspects. *Acta Biochim Pol*, **53**, 429-443.
- Potts, R.J., Beshpalov, I.A., Wallace, S.S., Melamede, R.J. and Hart, B.A. (2001) Inhibition of oxidative DNA repair in cadmium-adapted alveolar epithelial cells and the potential involvement of metallothionein. *Toxicology*, **161**, 25-38.

- Potts, R.J., Watkin, R.D. and Hart, B.A. (2003) Cadmium exposure down-regulates 8-oxoguanine DNA glycosylase expression in rat lung and alveolar epithelial cells. *Toxicology*, **184**, 189-202.
- Pouget, J.P., Ravanat, J.L., Douki, T., Richard, M.J. and Cadet, J. (1999) Measurement of DNA base damage in cells exposed to low doses of gamma-radiation: comparison between the HPLC-EC and comet assays. *Int J Radiat Biol*, **75**, 51-58.
- Puntarulo, S. (2005) Iron, oxidative stress and human health. *Mol Aspects Med*, **26**, 299-312.
- Purpero, V.M. and Moran, G.R. (2006) Catalytic, noncatalytic, and inhibitory phenomena: kinetic analysis of (4-hydroxyphenyl)pyruvate dioxygenase from *Arabidopsis thaliana*. *Biochemistry*, **45**, 6044-6055.
- Putney, J.W., Jr., Broad, L.M., Braun, F.J., Lievreumont, J.P. and Bird, G.S. (2001) Mechanisms of capacitative calcium entry. *J Cell Sci*, **114**, 2223-2229.

Q

- Quaife, C.J., Findley, S.D., Erickson, J.C., Froelick, G.J., Kelly, E.J., Zambrowicz, B.P. and Palmiter, R.D. (1994) Induction of a new metallothionein isoform (MT-IV) occurs during differentiation of stratified squamous epithelia. *Biochemistry*, **33**, 7250-7259.

R

- Rabilloud, T., Adessi, C., Giraudel, A. and Lunardi, J. (1997) Improvement of the solubilization of proteins in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*, **18**, 307-316.
- Rabilloud, T., Valette, C. and Lawrence, J.J. (1994) Sample application by in-gel rehydration improves the resolution of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients in the first dimension. *Electrophoresis*, **15**, 1552-1558.
- Rao, R.V., Ellerby, H.M. and Bredesen, D.E. (2004) Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. *Cell Death Differ*, **11**, 372-380.
- Reeves, P.G. and Chaney, R.L. (2001) Mineral status of female rats affects the absorption and organ distribution of dietary cadmium derived from edible sunflower kernels (*Helianthus annuus* L.). *Environ Res*, **85**, 215-225.
- Reeves, P.G. and Chaney, R.L. (2004) Marginal nutritional status of zinc, iron, and calcium increases cadmium retention in the duodenum and other organs of rats fed rice-based diets. *Environ Res*, **96**, 311-322.
- Reeves, P.G., Chaney, R.L., Simmons, R.W. and Cherian, M.G. (2005) Metallothionein induction is not involved in cadmium accumulation in the duodenum of mice and rats fed diets containing high-cadmium rice or sunflower kernels and a marginal supply of zinc, iron, and calcium. *J Nutr*, **135**, 99-108.
- Rello, S., Stockert, J.C., Moreno, V., Gamez, A., Pacheco, M., Juarranz, A., Canete, M. and Villanueva, A. (2005) Morphological criteria to distinguish cell death induced by apoptotic and necrotic treatments. *Apoptosis*, **10**, 201-208.
- Requena, J.R., Chao, C.C., Levine, R.L. and Stadtman, E.R. (2001) Glutamic and aminoadipic semialdehydes are the main carbonyl products of metal-catalyzed oxidation of proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 69-74.
- Ribble, D., Goldstein, N.B., Norris, D.A. and Shellman, Y.G. (2005) A simple technique for quantifying apoptosis in 96-well plates. *BMC Biotechnol*, **5**, 12.

- Rogalla, T., Ehrnsperger, M., Preville, X., Kotlyarov, A., Lutsch, G., Ducasse, C., Paul, C., Wieske, M., Arrigo, A.P., Buchner, J. and Gaestel, M. (1999) Regulation of Hsp27 oligomerization, chaperone function, and protective activity against oxidative stress/tumor necrosis factor alpha by phosphorylation. *J Biol Chem*, **274**, 18947-18956.
- Romero-Isart, N. and Vasak, M. (2002) Advances in the structure and chemistry of metallothioneins. *J Inorg Biochem*, **88**, 388-396.
- Rosengren, E., Aman, P., Thelin, S., Hansson, C., Ahlfors, S., Bjork, P., Jacobsson, L. and Rorsman, H. (1997) The macrophage migration inhibitory factor MIF is a phenylpyruvate tautomerase. *FEBS Lett*, **417**, 85-88.
- Roux, P.P. and Blenis, J. (2004) ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev*, **68**, 320-344.
- Ruetschi, U., Cerone, R., Perez-Cerda, C., Schiaffino, M.C., Standing, S., Ugarte, M. and Holme, E. (2000) Mutations in the 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase gene (HPD) in patients with tyrosinemia type III. *Hum Genet*, **106**, 654-662.
- Rutkowski, D.T. and Kaufman, R.J. (2004) A trip to the ER: coping with stress. *Trends Cell Biol*, **14**, 20-28.
- Ryu, D.Y., Lee, S.J., Park, D.W., Choi, B.S., Klaassen, C.D. and Park, J.D. (2004) Dietary iron regulates intestinal cadmium absorption through iron transporters in rats. *Toxicol Lett*, **152**, 19-25.

S

- Salceda, S. and Caro, J. (1997) Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J Biol Chem*, **272**, 22642-22647.
- Samaniego, F., Chin, J., Iwai, K., Rouault, T.A. and Klausner, R.D. (1994) Molecular characterization of a second iron-responsive element binding protein, iron regulatory protein 2. Structure, function, and post-translational regulation. *J Biol Chem*, **269**, 30904-30910.
- Satarug, S., Baker, J.R., Urbenjapol, S., Haswell-Elkins, M., Reilly, P.E., Williams, D.J. and Moore, M.R. (2003) A global perspective on cadmium pollution and toxicity in non-occupationally exposed population. *Toxicol Lett*, **137**, 65-83.
- Satarug, S. and Moore, M.R. (2004) Adverse health effects of chronic exposure to low-level cadmium in foodstuffs and cigarette smoke. *Environ Health Perspect*, **112**, 1099-1103.
- Satoh, M., Koyama, H., Kaji, T., Kito, H. and Tohyama, C. (2002) Perspectives on cadmium toxicity research. *Tohoku J Exp Med*, **196**, 23-32.
- Sauer, H., Wartenberg, M. and Hescheler, J. (2001) Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cell Physiol Biochem*, **11**, 173-186.
- Saydam, N., Adams, T.K., Steiner, F., Schaffner, W. and Freedman, J.H. (2002) Regulation of metallothionein transcription by the metal-responsive transcription factor MTF-1: identification of signal transduction cascades that control metal-inducible transcription. *J Biol Chem*, **277**, 20438-20445.
- Saydam, N., Steiner, F., Georgiev, O. and Schaffner, W. (2003) Heat and heavy metal stress synergize to mediate transcriptional hyperactivation by metal-responsive transcription factor MTF-1. *J Biol Chem*, **278**, 31879-31883.
- Schafer, S.G., Schwegler, U. and Schumann, K. (1990) Retention of cadmium in cadmium-naive normal and iron-deficient rats as well as in cadmium-induced iron-deficient animals. *Ecotoxicol Environ Saf*, **20**, 71-81.

- Scheufler, C., Brinker, A., Bourenkov, G., Pegoraro, S., Moroder, L., Bartunik, H., Hartl, F.U. and Moarefi, I. (2000) Structure of TPR domain-peptide complexes: critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine. *Cell*, **101**, 199-210.
- Schuchhardt, J., Beule, D., Malik, A., Wolski, E., Eickhoff, H., Lehrach, H. and Herzog, H. (2000) Normalization strategies for cDNA microarrays. *Nucleic Acids Res*, **28**, E47.
- Scott, C.R. (2006) The genetic tyrosinemias. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, **142**, 121-126.
- Segal, D., Ohana, E., Besser, L., Hershfinkel, M., Moran, A. and Sekler, I. (2004) A role for ZnT-1 in regulating cellular cation influx. *Biochem Biophys Res Commun*, **323**, 1145-1150.
- Segall, L., Mezzetti, A., Scanzano, R., Gargus, J.J., Purisima, E. and Blostein, R. (2005) Alterations in the alpha2 isoform of Na,K-ATPase associated with familial hemiplegic migraine type 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 11106-11111.
- Shafer, T.J. (1998) Effects of Cd²⁺, Pb²⁺ and CH₃Hg⁺ on high voltage-activated calcium currents in pheochromocytoma (PC12) cells: potency, reversibility, interactions with extracellular Ca²⁺ and mechanisms of block. *Toxicol Lett*, **99**, 207-221.
- Shaikh, Z.A., Vu, T.T. and Zaman, K. (1999) Oxidative stress as a mechanism of chronic cadmium-induced hepatotoxicity and renal toxicity and protection by antioxidants. *Toxicol Appl Pharmacol*, **154**, 256-263.
- Shukla, G.S., Shukla, A., Potts, R.J., Osier, M., Hart, B.A. and Chiu, J.F. (2000) Cadmium-mediated oxidative stress in alveolar epithelial cells induces the expression of gamma-glutamylcysteine synthetase catalytic subunit and glutathione S-transferase alpha and pi isoforms: potential role of activator protein-1. *Cell Biol Toxicol*, **16**, 347-362.
- Sikorski, E.M., Hock, T., Hill-Kapturczak, N. and Agarwal, A. (2004) The story so far: Molecular regulation of the heme oxygenase-1 gene in renal injury. *Am J Physiol Renal Physiol*, **286**, F425-441.
- Sikorski, E.M., Uo, T., Morrison, R.S. and Agarwal, A. (2006) Pescadillo interacts with the cadmium response element of the human heme oxygenase-1 promoter in renal epithelial cells. *J Biol Chem*, **281**, 24423-24430.
- Sinha, P., Poland, J., Schnolzer, M. and Rabilloud, T. (2001) A new silver staining apparatus and procedure for matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight analysis of proteins after two-dimensional electrophoresis. *Proteomics*, **1**, 835-840.
- Skaletsky, S.R.a.H.J. (2000) *Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers*. Humana Press, Totowa, NJ.
- Smirnova, I.V., Bittel, D.C., Ravindra, R., Jiang, H. and Andrews, G.K. (2000) Zinc and cadmium can promote rapid nuclear translocation of metal response element-binding transcription factor-1. *J Biol Chem*, **275**, 9377-9384.
- Somji, S., Todd, J.H., Sens, M.A., Garrett, S.H. and Sens, D.A. (2000) Expression of heat shock protein 60 in human proximal tubule cells exposed to heat, sodium arsenite and CdCl₂. *Toxicol Lett*, **115**, 127-136.
- Southern, E., Mir, K. and Shchepinov, M. (1999) Molecular interactions on microarrays. *Nat Genet*, **21**, 5-9.
- Souza, V., Bucio, L. and Gutierrez-Ruiz, M.C. (1997) Cadmium uptake by a human hepatic cell line (WRL-68 cells). *Toxicology*, **120**, 215-220.
- Souza, V., Escobar Mdel, C., Bucio, L., Hernandez, E. and Gutierrez-Ruiz, M.C. (2004) Zinc pretreatment prevents hepatic stellate cells from cadmium-produced oxidative damage. *Cell Biol Toxicol*, **20**, 241-251.
- Stadtman, E.R. and Berlett, B.S. (1997) Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Chem Res Toxicol*, **10**, 485-494.

- Stewart, D., Killeen, E., Naquin, R., Alam, S. and Alam, J. (2003) Degradation of transcription factor Nrf2 via the ubiquitin-proteasome pathway and stabilization by cadmium. *J Biol Chem*, **278**, 2396-2402.
- Stocker, R., Yamamoto, Y., McDonagh, A.F., Glazer, A.N. and Ames, B.N. (1987) Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science*, **235**, 1043-1046.
- Stohs, S.J. and Bagchi, D. (1995) Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic Biol Med*, **18**, 321-336.
- Sugisawa, N., Matsuoka, M., Okuno, T. and Igisu, H. (2004) Suppression of cadmium-induced JNK/p38 activation and HSP70 family gene expression by LL-Z1640-2 in NIH3T3 cells. *Toxicol Appl Pharmacol*, **196**, 206-214.
- Sun, X.M., MacFarlane, M., Zhuang, J., Wolf, B.B., Green, D.R. and Cohen, G.M. (1999) Distinct caspase cascades are initiated in receptor-mediated and chemical-induced apoptosis. *J Biol Chem*, **274**, 5053-5060.
- Swerts, K., De Moerloose, B., Dhooze, C., Laureys, G., Benoit, Y. and Philippe, J. (2006) Prognostic significance of multidrug resistance-related proteins in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Eur J Cancer*, **42**, 295-309.
- Swiergosz-Kowalewska, R. (2001) Cadmium distribution and toxicity in tissues of small rodents. *Microscopy Research and Technique*, **55**, 208-222.
- Swope, M., Sun, H.W., Blake, P.R. and Lolis, E. (1998) Direct link between cytokine activity and a catalytic site for macrophage migration inhibitory factor. *Embo J*, **17**, 3534-3541.
- Szpoganicz, B., Gidanian, S., Kong, P. and Farmer, P. (2002) Metal binding by melanins: studies of colloidal dihydroxyindole-melanin, and its complexation by Cu(II) and Zn(II) ions. *J Inorg Biochem*, **89**, 45-53.
- Szuster-Ciesielska, A., Stachura, A., Slotwinska, M., Kaminska, T., Sniezko, R., Paduch, R., Abramczyk, D., Filar, J. and Kandefer-Szerszen, M. (2000) The inhibitory effect of zinc on cadmium-induced cell apoptosis and reactive oxygen species (ROS) production in cell cultures. *Toxicology*, **145**, 159-171.

T

- Takeda, K., Fujita, H. and Shibahara, S. (1995) Differential control of the metal-mediated activation of the human heme oxygenase-1 and metallothionein IIA genes. *Biochem Biophys Res Commun*, **207**, 160-167.
- Takeda, K., Ishizawa, S., Sato, M., Yoshida, T. and Shibahara, S. (1994) Identification of a cis-acting element that is responsible for cadmium-mediated induction of the human heme oxygenase gene. *J Biol Chem*, **269**, 22858-22867.
- Tallkvist, J., Bowlus, C.L. and Lonnerdal, B. (2001) DMT1 gene expression and cadmium absorption in human absorptive enterocytes. *Toxicol Lett*, **122**, 171-177.
- Tan, Y., Rouse, J., Zhang, A., Cariati, S., Cohen, P. and Comb, M.J. (1996) FGF and stress regulate CREB and ATF-1 via a pathway involving p38 MAP kinase and MAPKAP kinase-2. *Embo J*, **15**, 4629-4642.
- Tang, W., Sadovic, S. and Shaikh, Z.A. (1998) Nephrotoxicity of cadmium-metalllothionein: protection by zinc and role of glutathione. *Toxicol Appl Pharmacol*, **151**, 276-282.
- Tanguay, R.M., Valet, J.P., Lescault, A., Duband, J.L., Laberge, C., Lettre, F. and Plante, M. (1990) Different molecular basis for fumarylacetoacetate hydrolase deficiency in the two clinical forms of hereditary tyrosinemia (type I). *Am J Hum Genet*, **47**, 308-316.
- Terman, A. and Brunk, U.T. (2006) Oxidative stress, accumulation of biological 'garbage', and aging. *Antioxid Redox Signal*, **8**, 197-204.

- Thannickal, V.J. and Fanburg, B.L. (2000) Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, **279**, L1005-1028.
- Thevenod, F. and Friedmann, J.M. (1999) Cadmium-mediated oxidative stress in kidney proximal tubule cells induces degradation of Na⁺/K⁺-ATPase through proteasomal and endo-/lysosomal proteolytic pathways. *Faseb J*, **13**, 1751-1761.
- Thevenod, F., Friedmann, J.M., Katsen, A.D. and Hauser, I.A. (2000) Up-regulation of multidrug resistance P-glycoprotein via nuclear factor-kappaB activation protects kidney proximal tubule cells from cadmium- and reactive oxygen species-induced apoptosis. *J Biol Chem*, **275**, 1887-1896.
- Tibbles, L.A., Ing, Y.L., Kiefer, F., Chan, J., Iscove, N., Woodgett, J.R. and Lassam, N.J. (1996) MLK-3 activates the SAPK/JNK and p38/RK pathways via SEK1 and MKK3/6. *Embo J*, **15**, 7026-7035.
- Tomoeda, K., Awata, H., Matsuura, T., Matsuda, I., Ploechl, E., Milovac, T., Boneh, A., Scott, C.R., Danks, D.M. and Endo, F. (2000) Mutations in the 4-hydroxyphenylpyruvic acid dioxygenase gene are responsible for tyrosinemia type III and hawkinsinuria. *Mol Genet Metab*, **71**, 506-510.
- Tournier, C., Whitmarsh, A.J., Cavanagh, J., Barrett, T. and Davis, R.J. (1999) The MKK7 gene encodes a group of c-Jun NH2-terminal kinase kinases. *Mol Cell Biol*, **19**, 1569-1581.
- Treiman, M. (2002) Regulation of the endoplasmic reticulum calcium storage during the unfolded protein response--significance in tissue ischemia? *Trends Cardiovasc Med*, **12**, 57-62.
- Treiman, M., Caspersen, C. and Christensen, S.B. (1998) A tool coming of age: thapsigargin as an inhibitor of sarco-endoplasmic reticulum Ca(2⁺)-ATPases. *Trends Pharmacol Sci*, **19**, 131-135.

U

- Uenishi, R., Gong, P., Suzuki, K. and Koizumi, S. (2006) Cross talk of heat shock and heavy metal regulatory pathways. *Biochem Biophys Res Commun*, **341**, 1072-1077.
- Urani, C., Melchiorretto, P., Canevali, C., Morazzoni, F. and Gribaldo, L. (2007) Metallothionein and hsp70 expression in HepG2 cells after prolonged cadmium exposure. *Toxicol In Vitro*, **21**, 314-319.
- Usai, C., Barberis, A., Moccagatta, L. and Marchetti, C. (1999) Pathways of cadmium influx in mammalian neurons. *J Neurochem*, **72**, 2154-2161.

V

- Valentine, R.A., Jackson, K.A., Christie, G.R., Mathers, J.C., Taylor, P.M. and Ford, D. (2007) ZnT5 Variant B Is a Bidirectional Zinc Transporter and Mediates Zinc Uptake in Human Intestinal Caco-2 Cells. *J Biol Chem*, **282**, 14389-14393.
- Vallee, B.L. and Falchuk, K.H. (1993) The biochemical basis of zinc physiology. *Physiol Rev*, **73**, 79-118.
- van Anken, E. and Braakman, I. (2005) Versatility of the endoplasmic reticulum protein folding factory. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, **40**, 191-228.
- Van Gelder, R.N., von Zastrow, M.E., Yool, A., Dement, W.C., Barchas, J.D. and Eberwine, J.H. (1990) Amplified RNA synthesized from limited quantities of heterogeneous cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 1663-1667.

- Varadi, A., Cirulli, V. and Rutter, G.A. (2004) Mitochondrial localization as a determinant of capacitative Ca²⁺ entry in HeLa cells. *Cell Calcium*, **36**, 499-508.
- Vernhet, L., Courtois, A., Allain, N., Payen, L., Anger, J.P., Guillouzo, A. and Fardel, O. (1999) Overexpression of the multidrug resistance-associated protein (MRP1) in human heavy metal-selected tumor cells. *FEBS Lett*, **443**, 321-325.

W

- Waalkes, M.P. (2003) Cadmium carcinogenesis. *Mutat Res*, **533**, 107-120.
- Wagner, E., Luche, S., Penna, L., Chevallet, M., Van Dorsselaer, A., Leize-Wagner, E. and Rabilloud, T. (2002) A method for detection of overoxidation of cysteines: peroxiredoxins are oxidized in vivo at the active-site cysteine during oxidative stress. *Biochem J*, **366**, 777-785.
- Waisberg, M., Joseph, P., Hale, B. and Beyersmann, D. (2003) Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology*, **192**, 95-117.
- Wang, J., Fillebeen, C., Chen, G., Biederbick, A., Lill, R. and Pantopoulos, K. (2007) Iron-dependent degradation of apo-IRP1 by the ubiquitin-proteasome pathway. *Mol Cell Biol*, **27**, 2423-2430.
- Wang, Z. and Templeton, D.M. (1998) Induction of c-fos proto-oncogene in mesangial cells by cadmium. *J Biol Chem*, **273**, 73-79.
- Watkin, R.D., Nawrot, T., Potts, R.J. and Hart, B.A. (2003) Mechanisms regulating the cadmium-mediated suppression of Sp1 transcription factor activity in alveolar epithelial cells. *Toxicology*, **184**, 157-178.
- Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M.B. and Johnson, G.L. (1999) Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev*, **79**, 143-180.
- Wolf, B.B. and Green, D.R. (1999) Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases. *J Biol Chem*, **274**, 20049-20052.
- Wu, C. (1995) Heat shock transcription factors: structure and regulation. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **11**, 441-469.

Y

- Yamada, H. and Koizumi, S. (2002) DNA microarray analysis of human gene expression induced by a non-lethal dose of cadmium. *Ind Health*, **40**, 159-166.
- Yaman, M., Kaya, G. and Simsek, M. (2007) Comparison of trace element concentrations in cancerous and noncancerous human endometrial and ovary tissues. *Int J Gynecol Cancer*, **17**, 220-228.
- Yanagiya, T., Imura, N., Enomoto, S., Kondo, Y. and Himeno, S. (2000) Suppression of a high-affinity transport system for manganese in cadmium-resistant metallothionein-null cells. *J Pharmacol Exp Ther*, **292**, 1080-1086.
- Yokouchi, M., Hiramatsu, N., Hayakawa, K., Kasai, A., Takano, Y., Yao, J. and Kitamura, M. (2007) Atypical, bidirectional regulation of cadmium-induced apoptosis via distinct signaling of unfolded protein response. *Cell Death Differ*.
- Youn, C.K., Kim, S.H., Lee, D.Y., Song, S.H., Chang, I.Y., Hyun, J.W., Chung, M.H. and You, H.J. (2005) Cadmium down-regulates human OGG1 through suppression of Sp1 activity. *J Biol Chem*, **280**, 25185-25195.

Yuan, X.M. and Brunk, U.T. (1998) Iron and LDL-oxidation in atherogenesis. *Apmis*, **106**, 825-842.

Z

Zhang, B., Georgiev, O., Hagmann, M., Gunes, C., Cramer, M., Faller, P., Vasak, M. and Schaffner, W. (2003) Activity of metal-responsive transcription factor 1 by toxic heavy metals and H₂O₂ in vitro is modulated by metallothionein. *Mol Cell Biol*, **23**, 8471-8485.

Zhou, G., Golden, T., Aragon, I.V. and Honkanen, R.E. (2004) Ser/Thr protein phosphatase 5 inactivates hypoxia-induced activation of an apoptosis signal-regulating kinase 1/MKK-4/JNK signaling cascade. *J Biol Chem*, **279**, 46595-46605.